

1967

MALATDEHYDROGENASE IN DER PERILYMPHE  
EIN VERGLEICH MIT DEN AKTIVITÄTEN  
IN SERUM UND LIQUOR

Inaugural - Dissertation

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Christian v. Deuster

aus Bad Kissingen

Würzburg 1967

LANE MEDICAL LIBRARY OF  
STANFORD UNIVERSITY  
300 PASTEUR ROAD  
PALO ALTO, CALIFORNIA



Aus der Universitätsklinik und Poliklinik  
für Hals-, Nasen- und Ohrenkranke  
Direktor: Professor Dr. med. H. L. Wullstein

---

MALATDEHYDROGENASE IN DER PERILYMPHE  
EIN VERGLEICH MIT DEN AKTIVITÄTEN  
IN SERUM UND LIQUOR

Inaugural - Dissertation

verfaßt und der  
Hohen Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
zur  
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von  
Christian v. Deuster  
aus Bad Kissingen

Würzburg 1967

Referent : Professor Dr. H. Wullstein

Tag der Promotion : 17. 8. 67

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität Würzburg

## (1000) Einleitung

|                                                                          |   |
|--------------------------------------------------------------------------|---|
| (1100) Problemstellung                                                   | 1 |
| (1200) Definition der MDH                                                | 2 |
| (1300) Vorkommen                                                         | 3 |
| (1400) Eigenschaften                                                     | 3 |
| (1410) Spezifität                                                        | 3 |
| (1420) Molekulargewicht                                                  | 4 |
| (1430) Katalysatorwirkung                                                | 4 |
| (1431) Substrataffinität                                                 | 4 |
| (1432) Hemstoffe                                                         | 5 |
| (1433) Ionenstärke                                                       | 5 |
| (1434) pH-Optimum                                                        | 6 |
| (1440) Trennbarkeit und Verhalten bei Chromatographie und Elektrophorese | 6 |
| (1450) Stabilität                                                        | 6 |

## (2000) Bestimmung der MDH-Aktivität

|                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------|----|
| (2100) Bestimmungsmethode                                                     | 7  |
| (2200) Möglichkeiten zur Verfälschung der Ergebnisse                          | 9  |
| (2210) Verfälschung durch methodische Fehler                                  | 9  |
| (2211) Pipettierfehler                                                        | 9  |
| (2212) Küvettenfehler                                                         | 10 |
| (2213) Fehler durch nichtlineare Kinetik                                      | 10 |
| (2220) Beeinflussung durch Aufbewahrungsfehler                                | 10 |
| (2221) Eindunstungsfehler                                                     | 10 |
| (2222) Fehlermöglichkeiten durch chemische Inaktivierung                      | 10 |
| (2230) Beeinflussung durch Entnahmefehler                                     | 12 |
| (2231) Fehler durch Blutbeimengungen                                          | 12 |
| (2232) Beeinflussung durch Spülflüssigkeit und Gewebswasser                   | 13 |
| (2233) Beeinflussung durch Gewebs-MDH                                         | 14 |
| (2234) Einfluß durch veränderte Entnahmebedingungen (verschiedene Operateure) | 15 |
| (2240) Beeinflussung durch pathologische Zustände im Organismus               | 16 |
| (2250) Einfluß des Alters                                                     | 18 |

(3000) Ergebnisse

|                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------|----|
| (3100) Ergebnisse bei der Perilymphe (P)                                             | 18 |
| (3110) Stichprobe                                                                    | 18 |
| (3120) Mittelwert der MDH-Aktivität                                                  | 19 |
| (3130) Häufigkeitsverteilung                                                         | 19 |
| (3140) Korrelation zwischen der MDH-Aktivität in venösem Serum und in der Perilymphe | 19 |
| (3200) Ergebnisse beim Kapillars serum (SK)                                          | 20 |
| (3210) Stichprobe                                                                    | 20 |
| (3220) Mittelwert der MDH-Aktivität                                                  | 21 |
| (3230) Häufigkeitsverteilung                                                         | 21 |
| (3300) Ergebnisse beim venösen Serum (SV)                                            | 22 |
| (3310) Stichprobe                                                                    | 22 |
| (3320) Mittelwert der MDH-Aktivität                                                  | 22 |
| (3330) Häufigkeitsverteilung                                                         | 23 |
| (3400) Ergebnisse beim Liquor (L)                                                    | 23 |
| (3410) Stichprobe                                                                    | 23 |
| (3420) Mittelwert der MDH-Aktivität                                                  | 23 |
| (3430) Häufigkeitsverteilung                                                         | 23 |
| (3500) Vergleich der Befunde                                                         | 24 |
| (3510) Vergleich der Aktivitäten in P, SK, SV und L                                  | 24 |
| (3520) Konzentrationsquotienten                                                      | 25 |
| (3530) Überlappungen                                                                 | 26 |

(4000) Tabellen

|                                     |    |
|-------------------------------------|----|
| (4100) Meßwerte von P, SK, SV und L | 28 |
| (4200) Vergleich von Unterproben    | 32 |

(5000) Tierversuche

|                          |    |
|--------------------------|----|
| (5100) Problemstellung   | 33 |
| (5200) Operationstechnik | 34 |

|                                                                                                                             | <u>Seite</u> |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| (5300) Meßmethode                                                                                                           | 35           |
| (5400) MDH-Aktivität in der Meerschweinchenperilymphe unter Einwirkung verschiedener Operationstraumen und Entnahmemethoden | 36           |
| (5500) Versuche zur Ermittlung der Sedimentationskonstante $S_{20w}$ der MDH in der Meerschweinchenperilymphe               | 40           |
| (5600) Versuche zur elektrophoretischen Auftrennung der MDH-Isozyme in der Meerschweinchenperilymphe                        | 48           |
| (6000) Tabellen                                                                                                             |              |
| (6100) Meßwerte der Tierversuche                                                                                            | 51           |
| (6200) Vergleich verschiedener Stichproben von Meerschweinchenperilymphe                                                    | 54           |
| (6300) Berechnung der Kinetik-Typen                                                                                         | 57           |
| (7000) Diskussion                                                                                                           | 63           |
| (8000) Zusammenfassung                                                                                                      | 69           |
| (9000) Literaturverzeichnis                                                                                                 | I-V          |

Lebenslauf



Digitized by the Internet Archive  
in 2026

## (1000) EINLEITUNG

=====

### (1100) Problemstellung

Im Unterschied zum Serum hat Perilymphe einen wesentlich geringeren Proteingehalt, andererseits liegen die Elektrolyte in vergleichbarer Konzentration vor (30, 31, 33, 38). Nimmt man nun an, daß Perilymphe in den sie umgebenden Wänden gebildet wird und die Ausgangsflüssigkeit somit Serum ist, dann muß in diesen eine bestimmte Maschengröße angenommen werden, durch welche die hochmolekularen Proteine nicht hindurchgelangen können. Auskunft über die Maschengröße kann das Diffusionsverhalten von Proteinen mit relativ kleinem Molekulargewicht in der Größenordnung von 20 000 bis 70 000 geben. Hierzu bietet sich die Malatdehydrogenase (MDH) an.

Auch die weitergehende Frage nach der Entstehung der Perilymphe, insbesondere ob sie aus Serum oder Liquor gebildet wird, bedarf noch der zusätzlichen Absicherung. Eine solche ermöglicht der Vergleich der Aktivitäten, da die MDH im Liquor in meßbarer Menge vorliegt. So müßte zum Beispiel bei der Entstehung der Perilymphe aus dem Liquor die Aktivität der Perilymphe wesentlich geringer sein, allenfalls dürfte sich ein kleiner positiver Aktivitätsgradient zwischen Liquor, Scala tympani und Scala vestibuli, verursacht durch einen Eindickungsvorgang, finden.

Schließlich ist jede Perilymphentnahme mit einem unphysiologischen Trauma verbunden. Es ist deshalb wichtig zu wissen, wieweit die wahren Aktivitätswerte durch Eingriffe von außen, z.B. verschiedene Operationsmethoden bei der Entnahme, verfälscht werden können. Da die MDH in den meisten Körperzellen vorkommt, ist ein direkter Zusammenhang zwischen der Stärke des Operationstraumas und der Höhe der MDH-Aktivität zu vermuten.



In der systematischen Nomenklatur wird das Enzym mit 1.1.1.37 bezeichnet (DIXON, WEBB, 11).

Infolge des deutschen Namens Äpfelsäuredehydrogenase findet sich in älteren Literaturstellen die Abkürzung ÄDH, unter MDH wurde die Milchsäuredehydrogenase verstanden, die jetzt als Laktatdehydrogenase (LDH) bezeichnet wird.

#### (1300) Vorkommen

Die MDH kommt in tierischen und pflanzlichen Geweben, in Bakterien, beim Menschen in den meisten Körperzellen vor. Allgemein ausgedrückt: in allen Zellen und Geweben, die sich des Zitronensäurezyklus bedienen. Hierbei konnte festgestellt werden, daß MDH teils frei im Cytoplasma (C-MDH), teils an Mitochondrien gebunden (M-MDH) auftritt, wobei sich die Enzyme nicht nur in Herkunft, sondern auch in ihren Eigenschaften unterscheiden (DAVIES, KUN, 6; DELBRÜCK, BÜCHER et al., 9, 10). In der Rattenleber ist das Mengenverhältnis der zwei Enzymarten C-MDH : M-MDH = 2:1. Im Herzmuskel ist fast alle MDH im Cytoplasma lokalisiert. Die absolute Aktivität im Cytoplasma ist nach (4) in der Leber am größten, dann folgen Herz, Skelettmuskel und Gehirn. DELBRÜCK wies große Aktivitäten im Bindegewebe und in gefäßlosen Geweben nach (7, 8). Bezüglich der extrazellulären Verteilung ist MDH in Serum, Liquor cerebrospinalis, Perilymphe, Gallenflüssigkeit, Fruchtwasser und Urin gefunden worden.

#### (1400) Eigenschaften

##### (1410) Spezifität

Die MDH - Isoenzyme sind weder spezifisch auf L-Malat, noch auf  $\text{NADH}_2$  eingestellt. Andere  $\alpha$ -Ketodicarbonsäuren, wie Dihydroxyfumarsäure, Diketobernsteinsäure, Mesoxalsäure,  $\alpha$ -Ketoglutarsäure, 2 - Keto - 3 - Sulfopropionsäure können ebenso umgesetzt werden wie  $\text{NADPH}_2$ , wenn auch bedeutend langsamer. L - und D - Laktat,

Asparaginat, Fumarat und D-Malat werden dagegen nicht angegriffen (42).

#### (1420) Molekulargewicht

Zwischen Herkunft der MDH-Isoenzyme und Molekulargewicht bestehen anscheinend gewisse Beziehungen:

Tabelle 1: Molekulargewicht der MDH

| Molekulargewicht | Herkunftsgewebe | Autor                                       |
|------------------|-----------------|---------------------------------------------|
| 15 000 - 20 000  | Rinderherz      | STRAUB in HOPPE-SEYLER/<br>THIERFELDER (42) |
| 40 000           | Schweineherz    |                                             |
| 52 000           | Ochsenherz      | DIXON, WEBB (11)                            |
| "                | Überstand       |                                             |
| 62 000           | Ochsenherz      |                                             |
|                  | Mitochondrien   |                                             |

STRAUB sieht jedoch einen möglichen Grund für die differierenden Molekulargewichte in den verschiedenen Herstellungsverfahren. Ebenso können Beziehungen zwischen Katalysatoreigenschaft und Herkunft festgestellt werden.

#### (1430) Katalysatorwirkung

Die Katalysatorwirkung der Enzyme ist abhängig von der Substrataffinität, von vorhandenen Hemmstoffen, von der Ionenstärke und vom pH.

#### (1431) Substrataffinität

Nach DELBRÜCK, BÜCHER et al. (9, 10) kann auf Grund der verschiedenen kinetischen Eigenschaften die mitochondriale von der cytoplasmatischen MDH unterschieden werden, wobei die C-MDH erst bei höherer Oxalessigsäurekonzentration gesättigt wird als das aus den Mitochondrien stammende Enzym. Hohe Oxalessigsäurekonzentrationen hemmen

die M-MDH stark. Zum gleichen Ergebnis kamen kurz zuvor auch DAVIES und KUN an der mitochondrialen MDH aus Rinderherzen (6). Bei Untersuchungen von MEHROTRA et al. (24) wurde die Serum-MDH des Menschen durch hohe Oxalacetatkonzentrationen nicht beeinflusst. Die Autoren nehmen deshalb an, daß sie cytoplasmatischen Ursprungs sei. E. SCHMIDT, F. W. SCHMIDT und HERFARTH (35, 36) fanden in menschlichen Leberzellen das Oxalacetat-Optimum für die cytoplasmatische MDH bei  $12-14 \times 10^{-4}$  mol und für die mitochondriale MDH bei  $1-2 \times 10^{-4}$  mol.

Folgende Oxalacetat-Konzentrationen sind für Messungen im Serum bei pH 7,5 optimal: bei akuter Hepatitis  $1,7 \times 10^{-3}$  mol, bei frischem Herzinfarkt  $0,8 \times 10^{-3}$  mol, bei hämolytischen Anämien  $1,4 \times 10^{-3}$  mol und bei Bronchial-Carcinom  $3,7 \times 10^{-3}$  mol (E. SCHMIDT und F. W. SCHMIDT, 34).

Diese Autoren konnten außerdem zeigen, daß sich bei verschiedenen Organerkrankungen die Substrataffinität in Serum und Herkunftsgewebe als nicht identisch erweisen und daß sie sich mit der Verweildauer des Enzyms im Serum ändern.

#### (1432) Hemmstoffe

Für die Erhaltung der katalytischen Funktion genügt es, wenn ein Teil der im Enzym vorhandenen SH-Gruppen in freier Form vorliegt. Erst nach Blockierung aller SH-Gruppen wird es irreversibel inaktiviert. Hemmend wirken folgende Substanzen: Thyroxin, Trijodthyronin, Sulfite, Fumarsäure, nicht hemmend dagegen Fluoride, Malonat und Dinitrophenol (42).

#### (1433) Ionenstärke

WILSON und BURTON zeigten, daß die Katalysatorwirkung außerdem von der Ionenstärke abhängig ist (s. Kapitel 1200).

#### (1434)pH-Optimum

Je komplexer die Enzym-Zusammensetzung ist, desto deutlicher liegt das Aktivitäts-Optimum zwischen pH 7-8 (42).

#### (1440)Trennbarkeit und Verhalten bei Chromatographie und Elektrophorese

E. SCHMIDT, F. W. SCHMIDT und HERFARTH (36) erhielten bei fraktionierter Extraktion menschlicher Leberzellen mit nachfolgender chromatographischer Trennung an DEAE-Zellulose-Säulen eine nicht am Austauscher haftende mitochondriale Komponente (M-Form), die in der ersten Fraktion erschien, sowie eine mäßig haftende C-Form. Bei nachfolgender Elektrophorese wanderte die M-Form kathodisch, die C-Form anodisch.

THORNE, GROSSMAN und KAPLAN (44) trennten mit der Stärkegelelektrophorese 6 MDH-Fraktionen in Schweineherzmitochondrien auf. ENGELHARDT-GÖLKEL, LÖBEL, SEITZ und WOLLER (13) wiesen bei papierelektrophoretischen Untersuchungen mit der Methode nach GRASSMAN-HANNIG die MDH in der  $\beta$ -Globulinfraktion nach.

#### (1450)Stabilität

Die MDH ist wegen ihrer SH-Gruppen sauerstoffempfindlich. Das gereinigte Enzym wird in wässriger Lösung beim Stehen irreversibel inaktiviert, ist aber unter  $N_2$  oder nach Zusatz von Cystein oder Dithiothreitol gut haltbar. Ebenso kann es durch Suspension in 0,7 - gesättigter Ammoniumsulfatlösung monatelang stabilisiert werden. PFLEIDERER und HOHNHOLZ (29) erreichten dies durch Anfügen eines Sulfit-DPN Simplexes.

Wie in wässriger Lösung mag es auch sein, daß das Enzym nach dem Einströmen in das Blut durch den plasmatisch gelösten Sauerstoff inaktiviert wird.

Bezüglich der Haltbarkeit der Enzymaktivität siehe unter 2222.

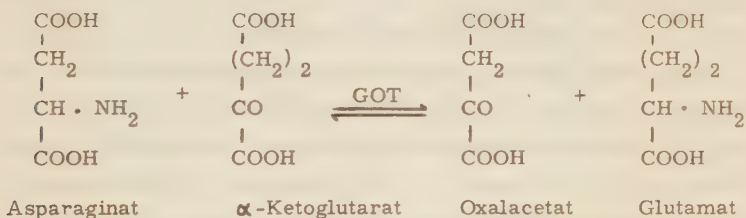
# (2000) BESTIMMUNG DER MDH-AKTIVITÄT.

## (2100) Bestimmungsmethode

Eine von BARCROFT begründete und durch WARBURG weiterentwickelte manometrische Methode, bei der ein Gasvolumen auf dem Umweg einer Druckmessung bei gleichbleibendem Volumen bestimmt wird, ist ungebräuchlich.

Die MDH-Aktivität wird heute allgemein über die eingangs genannte Reaktion durch Messen der  $\text{NADH}_2$  - Abnahme bestimmt, die sich durch Extinktionsänderung anzeigt (Prinzip des optischen Tests nach WARBURG).

Die Ausführung des optischen Tests wird meist in der Weise modifiziert, daß man anstelle der Verwendung von fertigem Oxalacetat dieses durch Umsatz von Asparaginat mit  $\alpha$  -Ketoglutarat in der Küvette erzeugt:



Dadurch lassen sich wesentliche Schwierigkeiten, die durch Instabilität der Oxalessigsäure hervorgerufen werden, vermeiden. Insbesondere würde durch ihr Dekarboxylierungsprodukt Pyruvat und das im Testansatz befindliche  $\text{NADH}_2$  die Laktat-Dehydrogenase miterfaßt.

In den vorliegenden Untersuchungen wurden die Bestimmungen mit der Testkombination der Firma Boehringer und nach deren Anweisungen durchgeführt, wobei die Volumina wie folgt modifiziert wurden:

Tabelle 2 : Testansatz

|                        | <u>Fa. Boehringer</u> | <u>Modifikationen</u> |       |
|------------------------|-----------------------|-----------------------|-------|
|                        | (ml)                  | ( $\mu$ l)            |       |
| Puffer                 | 2,75 (3,00)           | 29,85                 | 29,85 |
| $\alpha$ -Ketoglutarat | 0,05                  | 0,52                  | 0,70  |
| NADH <sub>2</sub>      | 0,05                  | 0,52                  | 0,70  |
| GOT                    | 0,05                  | 0,40                  | 0,70  |
| Probe                  | 0,10                  | 0,48                  | 0,70  |

Als Meßinstrument diene ein Beckman-Spektralphotometer DU.

Die Mikroküvette mit Thermostat-Einrichtung faßte etwa 30  $\mu$ l.

Es ist bekannt, daß jedem Isoenzym ein pH-Bereich zukommt, in dem seine Aktivität ein Maximum hat. Da die Isoenzymzusammensetzung der Körperflüssigkeiten von mancherlei Faktoren abhängig ist (siehe unten), bringt es keinen nennenswerten Erkenntnisgewinn, die Reaktion bei den jeweils optimalen pH-Verhältnissen ablaufen zu lassen. Wesentlich mehr würden Aktivitätsbestimmungen außerhalb des Maximalbereichs aussagen können. Eine Aufschlüsselung der Isoenzymzusammensetzung gelingt nur durch Aktivitätsmessungen über einen größeren pH-Bereich und ist bei der Perilymphe wegen der zu geringen Probemenge ausgeschlossen.

Bei der Aktivitätsmessung wurden sechs bis zehn Extinktionsablesungen in einminütigem Abstand vorgenommen, deren Mittelwerte in die Berechnungen eingingen.

#### Definition der Enzymaktivität

Die Aktivität eines Enzyms wird definiert durch die Geschwindigkeit der durch das Enzym katalysierten Reaktion. Das Maß hierfür ist die Enzym-Einheit (BERGMEYER, 3). Die Commission on Enzymes of the International Union of Biochemistry (IUB) hat 1961 die "Internationale

Enzym-Einheit" folgendermaßen festgelegt (32): 1 Einheit ist die Enzymmenge, die bei 25° C in 1 Minute 1  $\mu$  Mol Substrat umsetzt. 1 Millieinheit = 1/1000 Einheit. In biologischem Material wie Blut oder Serum soll auf 1 ml bzw. 1000 ml bezogen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden sämtliche Enzymaktivitäten in Internationalen Millieinheiten (int. m. E.) angegeben.

#### (2200) Möglichkeiten zur Verfälschung der Ergebnisse

Nachdem die mikroanalytischen Methoden mit erheblichen technischen Schwierigkeiten verbunden sind, die häufig zu Fehlern führen können, ist es notwendig, die Fehlerquellen eingehend zu diskutieren.

#### (2210) Verfälschung durch methodische Fehler

##### (2211) Pipettierfehler

Eine mit Quecksilber geeichte Probenpipette hatte ein Volumen von 0,8286  $\mu$ l. Die nachfolgende Eichung mit perilymphähnlichen Flüssigkeiten, wie Serum, Liquor cerebros spinalis und Fruchtwasser ergab jedoch nur 0,7017  $\pm$  0,0033  $\mu$ l. Der höhere Quecksilber-Wert kann darauf zurückzuführen sein, daß die Polyäthylenkapillare durch Quecksilber nicht benetzbar ist und dieses außerdem durch seine Kohäsionskraft die Kapillare auszuweiten versucht. Weiterhin wird das Pipettenvolumen bei längerer Benutzung geringer. Beim Spülen und Trocknen werden Schmutz- und Staubpartikel angesaugt, die sich an der Wand niederschlagen, zum anderen kommt es durch diese Manipulationen zu einer gewissen Kontraktion der Kapillare. Aus diesen Gründen wird das bei einer Mikropipette ohnehin schon ungünstige Verhältnis des Volumens zur angrenzenden Oberfläche noch mehr zu ungunsten des Volumens verschoben.

Als Volumen wurde der mit perilymphähnlichen Flüssigkeiten gefundene Eichwert von 0,7017  $\mu$ l benutzt. Der mittlere Pipettierfehler betrug dabei 0,0033  $\mu$ l.

In analoger Weise wurden alle Pipetten überprüft.

#### (2212) Küvettenfehler

Die Ermittlung der effektiven Schichtdicke der Mikroküvette durch Eichung mit einer Pikrinsäurelösung ergab den Wert 0,900 cm, der in die Berechnungen einging. Eine eventuelle Drift am Spektralphotometer wurde durch die Dunkelstromkorrektur berücksichtigt. Die Schwankungen des Null-Galvanometers sind statistischer Art und fallen durch die Mittlung nicht ins Gewicht.

#### (2213) Fehler durch nichtlineare Kinetik

Wurden beim venösen Serum die Mittelwerte der vier ersten Minutenablesungen (laut Gebrauchsanleitung) denjenigen aller Ablesungen im Ein-Minuten-Intervall gegenübergestellt, meist zwischen sechs und zehn, so waren erstere leicht erhöht, im Mittel um den Faktor 1,062. Bei den vorliegenden Untersuchungen wurde dieser geringfügige Gang nicht berücksichtigt und alle Messungen zur Mittelwertsbildung herangezogen.

#### (2220) Beeinflussung durch Aufbewahrungsfehler

##### (2221) Eindunstungsfehler

Bei Aufbewahrung der Proben im Kühlschrank muß an eine Eindunstung gedacht werden. Der vorhandene Temperaturgradient bewirkt, daß Flüssigkeit aus der nicht verschlossenen Kapillare entweicht und sich an den Kühlrippen niederschlägt. Dieser Fehler läßt sich durch beiderseitiges Abschmelzen der Kapillare vermeiden.

##### (2222) Fehlermöglichkeiten durch chemische Inaktivierung

Es ist zu vermuten, daß die Enzyme in den Proben mit der Zeit durch den gelösten Sauerstoff oxydativ abgebaut werden. Ob dieser Abfall identisch mit dem von SÜDHOF und WÖTZEL (43) genannten ist, steht

noch aus.

Von der Möglichkeit, das Enzym in dieser Hinsicht zu stabilisieren (Kapitel 1450), konnte aus Verdünnungsgründen kein Gebrauch gemacht werden.

Bei ungenügend rascher Aufarbeitung des Untersuchungsmaterials muß man innerhalb von Stunden bereits mit einem merklichen Aktivitätsverlust rechnen. Dieser Abfall im Serum geht bei der MDH im Vergleich zu einigen anderen Enzymen langsamer vonstatten, und zwar beträgt er nach 24 Stunden bei Raumtemperatur ca. 17 %, bei 4°C ca. 11 % und eingefroren bei -20°C ca. 2 % der ursprünglichen Aktivität (SÜDHOF, WÖTZEL).

Das Untersuchungsmaterial wurde deshalb nach der Entnahme sogleich abzentrifugiert, bei 4°C aufbewahrt und innerhalb 2-8 Stunden ausgewertet.

Auf Grund der Feststellung von SÜDHOF und WÖTZEL, daß die Enzymaktivität bei Aufbewahrung der Probe im tiefgefrorenen Zustand wie bei Normaltemperatur abfällt, muß, um die effektiv im Serum vorhandene Aktivität zu erhalten, auf den Zeitpunkt 0, das heißt die Entnahmezeit, extrapoliert werden. Dies erfordert die Kenntnis des Inaktivierungsmechanismus, der zudem von grundsätzlicher Bedeutung ist. Geht man von einigen möglichen einfachen Reaktionsmechanismen aus, so können durch deren Berechnung Kriterien gefunden werden, die Aussagen über ein Zutreffen dieser Modelle gestatten.

Als einfachste Möglichkeit sei der natürliche Zerfall angenommen, eine Reaktion vom Typ  $A \rightarrow B$  (Typ 1).

Zum anderen läßt sich vorstellen, daß das Enzym durch Inhibitoren irreversibel oder reversibel nach dem Mechanismus  $A + B \rightleftharpoons C$  (Typ 2) inaktiviert wird.

Schließlich ist noch an einen einfachen irreversiblen Umlagerungsmechanismus aus einer metastabilen Strukturform des Enzyms zu denken (Typ 3 :  $A \rightleftharpoons B \rightarrow C$ ).

Die mathematische Überprüfung zeigt, daß Typ 3 formal die größte Wahrscheinlichkeit zukommt. Es ist möglich, damit die experimentellen Befunde von SÜDHOF und WÖTZEL einigermaßen befriedigend zu erklären. Die Extrapolation auf  $t = 0$  ergibt, daß mit einem etwa 10 %igem Aktivitätsverlust während der Lagerzeit von 3 Stunden nach Entnahme gerechnet werden muß. Näheres findet sich unter 6300.

#### (2230) Beeinflussung durch Entnahmefehler

#### (2231) Fehler durch Blutbeimengungen

Die Perilymphe wiesen teilweise Blutbeimengungen auf, die durch das Vorhandensein von intakten Erythrozyten gekennzeichnet sind. Damit konnte exakt und einfach über die Bestimmung des Hämatokritwertes der Blutgehalt ermittelt werden. Von einer zweiten häufig angewendeten Möglichkeit (RAUCH, 31), nämlich den Blutgehalt über die Vermessung der Soret-Bande zu bestimmen, wurde deshalb abgesehen, weil sie die vollständige Hämolyse der in der Perilymphe enthaltenen Erythrozyten zur Voraussetzung hat, die nur durch künstlichen Zusatz von hämolysierenden Substanzen oder bestimmte physikalische Einwirkungen (zum Beispiel Ultraschall) erreicht werden kann.

Eine Lösung mit 1 ‰ hydrolysiertem Sediment hatte bei einer Schichtdicke von 1 cm eine Extinktion von ungefähr 1,5. Deshalb konnte beim Betrachten in Längsrichtung der in einer Kapillare (Länge 3 cm, Durchmesser ca. 0,3 mm) enthaltenen Perilymphe die Rotfärbung ohne Schwierigkeit mit bloßem Auge erkannt werden. Dies entsprach etwa dem Gehalt von 2 ‰ hämolysiertem Blut. Lösungen, die mehr als 2 ‰ Hämolyolat enthalten, können damit aussortiert und verworfen werden. Dies ist wichtig, da Erythrozyten reichlich MDH enthalten (14, 16).

Ob zwischen Blutgehalt und MDH-Aktivität in der zentrifugierten Perilymphe eine Korrelation besteht, wurde überprüft. Ein Maß hierfür ist

der Korrelationskoeffizient, der sich zu 0,199 ergab. Mit einem Prüfquotient  $\frac{T}{S_r}$  (12) von 1,30 lag die Signifikanzwahrscheinlichkeit zwischen 0,2 und 0,3, das heißt der Korrelationskoeffizient unterschied sich damit nicht signifikant von 0, wenn man 0,05 als Schranke zugrunde legte. Das bedeutet, daß so aufbereitete Perilymphe (s.S. 11) nur mit einer vernachlässigbaren, durch Hämolyse bedingten Enzymverfälschung verbunden ist.

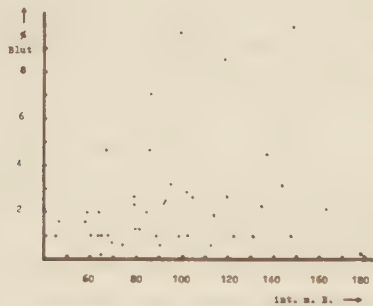


Abbildung 1: Zusammenhang zwischen relativem Blutgehalt und MDH-Aktivität in der Perilymphe. Erläuterung im Text.

#### (2232) Beeinflussung durch Spülflüssigkeit und Gewebswasser

- a. Spülflüssigkeit: Bei der Stapedolyse wird nach Zurückschlagen des Trommelfells die Paukenhöhle mit physiologischer Kochsalzlösung ausgespült und anschließend wieder freigesaugt. Es ist denkbar, daß sich Reste dieser Spülflüssigkeit in Nischen zurückhalten können und unter Umständen die Perilymphe im Sinne einer Verdünnung verändern.
- b. Gewebswasser: Es hat sich gezeigt, daß nach dem Freipräparieren der Stapesfußplatte Gewebssäure auftreten kann. Da über deren MDH-Gehalt noch keine Aussagen vorliegen - sie mag im Bereich

des venösen Serums liegen - ist es sehr schwierig, den Grad der Verfälschung zu beurteilen.

Fehler, die möglicherweise durch die beiden genannten Punkte bedingt sind, wurden nicht berücksichtigt.

#### (2233) Beeinflussung durch Gewebs-MDH

Bei der Gewinnung von Kapillarserum besteht die Möglichkeit, daß durch die Gewebsverletzung bei der Inzision cytoplasmatische und mitochondriale MDH freigesetzt werden und in die Probe gelangen. Versuche mit der Ultrazentrifuge ergaben jedoch keinen signifikanten Aktivitätsunterschied vor und nach der Zentrifugation, wie die untenstehende Tabelle zeigt.

Nach HOGEBOOM (19) können Mitochondrien durch zehninminütige Zentrifugation bei 5000 g gewonnen werden. Zur nachfolgenden Reinigung zentrifugierte er die in 0,25 mol Rohrzuckerlösung aufgeschwemmten Mitochondrien 10 Minuten bei 24 000 g. Danach kann angenommen werden, daß eine 25-minütige Zentrifugation bei 10 000 g zur Abscheidung möglicherweise vorhandener Mitochondrien im Kapillarserum ausreicht, wie dies bei den folgenden 15 Proben durchgeführt wurde.

Tabelle 3 : Zusammenstellung der zentrifugierten und nicht zentrifugierten Kapillarseren

| Patient | $\bar{A}$ nicht zentrifugiert | $\bar{A}$ zentrifugiert |
|---------|-------------------------------|-------------------------|
| 1       | 46,3                          | 38,9                    |
| 2       | 63,0                          | 51,9                    |
| 3       | 63,9                          | 61,1                    |
| 4       | 92,6                          | 118,5                   |
| 5       | 44,4                          | 43,5                    |
| 6       | 59,3                          | 65,7                    |
| 7       | 70,4                          | 58,3                    |

| Patient | $\bar{A}$ nicht zentrifugiert | $\bar{A}$ zentrifugiert |
|---------|-------------------------------|-------------------------|
| 8       | 77, 8                         | 80, 6                   |
| 9       | 37, 0                         | 34, 3                   |
| 10      | 75, 0                         | 80, 6                   |
| 11      | 92, 6                         | 115, 8                  |
| 12      | 62, 0                         | 63, 9                   |
| 13      | 84, 3                         | 75, 0                   |
| 14      | 134, 3                        | 127, 8                  |
| 15      | 67, 6                         | 66, 7                   |
|         | N = 15                        | N = 15                  |
|         | $\bar{X}$ = 71, 4             | $\bar{X}$ = 72, 2       |
|         | s = 23, 9                     | s = 28, 7               |

$\bar{A}$  = MDH-Aktivität

Man darf deshalb annehmen, daß das Kapillarserum nur unterhalb der Fehlergrenze liegende mitochondriale MDH enthalten kann.

Im menschlichen Bindegewebe und in Gefäßen ist MDH nachgewiesen worden (7, 39). So ist es denkbar, daß bei der Venenpunktion Spuren von MDH in die Kanüle gelangen können. Da die aspirierte Blutmenge im allgemeinen 5 bis 10 ml beträgt, kann diese Fehlermöglichkeit vernachlässigt werden.

Beiden Liquores handelte es sich nach Angaben der Neurologischen Universitätsklinik und der Universitäts-Nervenklinik um nicht pathologisch veränderte Lumbaliquores.

#### (2234) Einfluß durch verschiedene Entnahmebedingungen

Ein Vergleich der Mittelwerte bei den Perilymphnen in Abhängigkeit vom Operateur ergab deutliche Unterschiede, wie die Tabelle zeigt.

Tabelle 4 : MDH-Aktivität in der Perilymphe in Abhängigkeit vom Operateur

| Operateur | I     | II   | III   | IV   |
|-----------|-------|------|-------|------|
| N         | 33    | 10   | 4     | 3    |
| $\bar{X}$ | 100,0 | 82,4 | 111,3 | 69,0 |
| s         | 27,5  | 24,8 | 51,6  | 13,9 |

Damit ist gezeigt, daß die Operationsmethode einen Einfluß auf die Enzymaktivität haben kann. Wegen der teilweise zu geringen Anzahl muß auf eine weitergehende statistische Aussage verzichtet werden.

(2240) Beeinflussung durch pathologische Zustände ausschließlich  
Otosklerose und Operationsstress

Eine solche wurde angenommen, wenn die Erhöhung die zweifache Standardabweichung überschreitet. Dies konnten MERTEN und SOLBACH (25), sowie ENGELHARDT - GÖLKEL, LÖBEL, SEITZ und WOLLER (13) am Beispiel der Serum - MDH bei folgenden Krankheiten beobachten:

|                                   | <u>Fälle</u> |
|-----------------------------------|--------------|
| schwere akute Hepatitis           | 35           |
| aktive Leberzirrhose              | 38           |
| Stauungsikterus (Steinverschluß)  | 9            |
| myeloische Leukämie               | 10           |
| akute lymphatische Leukämie       | 2            |
| chronische lymphatische Leukämie  | 3            |
| Myeloblastenleukämie              | 3            |
| unbehandelte Perniciosa           | 1            |
| hämolytische Anämie (Marchiafava) | 1            |
| akute gelbe Leberatrophie         | 1            |

Ein Mittelwert  $< 2 s$  fand sich bei

|                                                                                                                             | <u>Fälle</u> |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| akuten und chronischen Entzündungen<br>(Pneumonie, Cholecystitis, Colitis,<br>Appendicitis, Parametritis, Tonsil-<br>litis) | 40           |
| exsudativer cavernöser Lungentuber-<br>kulose                                                                               | 28           |
| Lymphogranulomatose                                                                                                         | 27           |
| Stauungsikterus (Tumorverschuß)                                                                                             | 12           |
| Kehlkopfcarcinom                                                                                                            | 46           |
| Bronchialcarcinom                                                                                                           | 83           |
| Magen-Darm-Carcinom                                                                                                         | 16           |
| Mamma-Carcinom                                                                                                              | 24           |
| Collum-, Corpuscarcinom                                                                                                     | 50           |

Von der gesamten Carcinomgruppe sind Früh- und Spätstadien erfaßt, jeweils behandelte als auch unbehandelte (MERTEN, SOLBACH). Eine unsichere Erhöhung der MDH-Aktivität wurde beim Herzinfarkt angenommen, da bei MERTEN und SOLBACH (3 Fälle) die doppelte Standardabweichung überschritten wird, bei ENGELHARDT-GÖLKEL (3 Fälle) dagegen nicht.

Bei Thyreotoxikose fand man eine parallel zur Grundumsatzsteigerung erhöhte Aktivität (39).

Bei den Patienten, deren Untersuchungsmaterial für die folgenden Statistiken herangezogen wurde, konnten alle diese Erkrankungen ausgeschlossen werden.

Zum Austritt zellständiger Enzyme sind nicht unbedingt Zellnekrosen erforderlich, es genügt bereits eine gestörte Energieversorgung der Zelle (z.B. in Schock, Kollaps, bei Hemmung der Atmungsfermente u.a.). Interessant sind in diesem Zusammenhang die Arbeiten von BRUNS et al. (5), HESS (17), GERLACH (15) und LAUDAHN (22).

### (2250) Einfluß des Alters auf die Enzymaktivität

MERTEN und SOLBACH (25) fanden bei 20 gesunden Patienten über 60 Jahre eine signifikante Erhöhung der MDH-Aktivität von  $\bar{X} = 127 \pm 25,8$  m.E. gegenüber  $57,0 \pm 32,4$  m.E.

Zur Überprüfung des vorliegenden Untersuchungsgutes auf eine Altersabhängigkeit der MDH-Aktivität wurden die Korrelationskoeffizienten zwischen dem Alter der Patienten und Patientinnen und jeweils ihren Serum-Enzymaktivitäten gebildet. Ein Unterschied der Koeffizienten von 0 konnte dabei weder gesichert noch angenommen werden. Näheres siehe unter 3310. HAUG und GATHOF (16) konnten bei 89 Patienten ebenfalls keine Abhängigkeit der MDH-Aktivität vom Alter feststellen.

### (3000) ERGEBNISSE

=====

#### (3100) Ergebnisse bei der Perilymphe (P)

##### (3110) Stichprobe

Untersucht wurden die Perilymphe von 17 Patienten und 33 Patientinnen. Das mittlere Alter betrug bei den Patienten  $46,1 \pm 12,4$  Jahre und bei den Patientinnen  $44,1 \pm 14,6$  Jahre. Nach der Bevölkerungsstatistik (41) besteht zwischen dem Anteil der Männer und Frauen an der Gesamtbevölkerung kein Unterschied. Damit sind die exakten 95 %igen Vertrauensgrenzen (Documenta Geigy, Wissenschaftliche Tabellen, 6. Auflage, Seite 88) für  $N = 50$  und einen 34 %igen Anteil von Männern an Otosklerosekranken 21, 21 und 48, 77. Das bedeutet, daß mit einer Signifikanzwahrscheinlichkeit von  $2\alpha < 0,05$  mehr Frauen als Männer an Otosklerose erkranken.

Der mittlere Blutgehalt der Proben war  $2,25 \pm 2,44$  %, was die Enzymaktivität jedoch nicht statistisch signifikant beeinflusste (siehe Kapitel 2231).

Die Proben wurden von vier verschiedenen Operateuren gewonnen. Abweichungen in diesem Zusammenhang finden sich unter 2234.

#### (3120) Mittelwert der MDH-Aktivität

Die mittlere Enzymaktivität war bei den Männern  $87,1 \pm 25,2$  int. m. E., bei den Frauen  $99,9 \pm 31,4$  int. m. E. Mit dem WILCOXON-Test ergibt sich zwischen diesen beiden Werten kein Unterschied. Die 95 %igen Vertrauensschranken sind 319 und 548. Die Rangsumme 380 liegt zwischen diesen Werten und zeigt eine Tendenz nach unten. Eine Folgerung etwa in der Art, daß die MDH-Aktivität bei den Männern geringer ist als bei den Frauen, kann z.B. nicht gezogen werden. Auf Grund dieses statistisch nicht zu sichernden Unterschiedes ist es erlaubt, beide Stichproben zusammenzufassen.

Die mittlere Aktivität beträgt dann  $95,6 \pm 29,9$  int. m. E.

In diesem Kollektiv sind die Werte aus zwei nicht-otoskerotischen Ohren mit einem Mittel von  $58,1$  int. m. E. enthalten. Wenn dieser Wert auch deutlich unter  $95,6$  int. m. E. liegt, so muß wegen der geringen Anzahl auf eine Schlußfolgerung verzichtet werden. Bei der Erörterung, inwieweit das Operationstrauma bei der Perilymphentnahme die MDH-Aktivität beeinflusst, wird auf diesen Punkt noch zurückzukommen sein (Kapitel Tierversuche, Diskussion).

#### (3130) Häufigkeitsverteilung

Mit einer Signifikanzwahrscheinlichkeit von  $2\alpha \begin{matrix} 0,90 \\ \nearrow \\ 0,80 \end{matrix}$  bei  $\nu = 10$  und  $\chi^2 = 5,175$  kann die Verteilung als normal bezeichnet werden.

#### (3140) Beziehungen zwischen der MDH-Aktivität im venösen Serum und in der Perilymphe

Bei 16 Patienten wurden gleichzeitig die Serum-Enzym-Aktivitäten (SV) mitbestimmt. Als Korrelationskoeffizient zwischen der Aktivität von P und SV fand sich  $0,073$ , das heißt die Signifikanzwahrscheinlichkeit  $2\alpha$

liegt zwischen 0,80 und 0,70. Damit unterscheidet sich der Korrelationskoeffizient nicht von 0. Obgleich einzelne Befunde auf eine Beeinflussung der Perilymphwerte durch die Höhe der Serum-Enzymaktivität hinweisen, muß doch auf Grund der Statistik eine solche, zumindest solange der Einfluß des mechanischen Traumas noch nicht berücksichtigt werden kann, verneint werden.

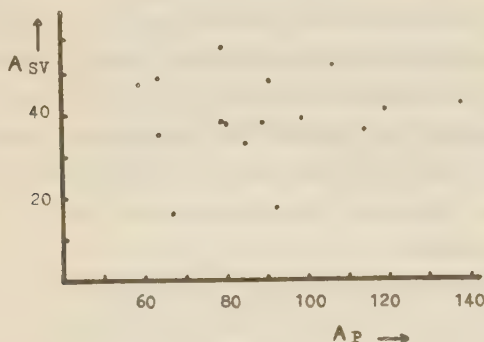


Abbildung 2: Zusammenhang zwischen der MDH-Aktivität in venösem Serum und Perilymphe bei denselben Patienten.

#### (3200) Ergebnisse beim Kapillarserum (SK)

##### (3210) Stichprobe

Der Stichprobenumfang umfaßt 60 Personen verschiedenen Alters und Geschlechts. Ein Vergleich der Aktivität im SK der Männer mit dem der Frauen ergab keinen statistischen Unterschied (siehe Kapitel 4200).

Das Alter der Patienten betrug bei den Männern  $36,8 \pm 15,7$  Jahre, bei den Frauen  $38,5 \pm 18,6$  Jahre und war damit etwas niedriger als das Durchschnittsalter der Patienten, bei denen die Aktivität in der Perilymphe gemessen wurde.

Die Kapillarserven wurden aus Fingerbeere oder Ohrläppchen, und zwar in 3 Fraktionen (SK<sub>1</sub>, SK<sub>2</sub>, SK<sub>3</sub>), entnommen.

### (3220) Mittelwerte der MDH-Aktivität

Die Mittelwerte finden sich in folgender Tabelle:

Tabelle 5 : Mittelwerte beim Kapillarserum (int. m. E.)

|                                          | N  | $\bar{X}$ | s     |
|------------------------------------------|----|-----------|-------|
| SK <sub>1</sub>                          | 73 | 72, 2     | 28, 0 |
| SK <sub>2</sub>                          | 58 | 64, 5     | 29, 0 |
| SK <sub>3</sub>                          | 56 | 61, 7     | 30, 1 |
| SK <sub><math>\frac{2+3}{2}</math></sub> | 60 | 63, 5     | 27, 9 |

In SK<sub>1</sub> sind 13 Werte von Proben enthalten, bei denen nur eine Fraktion I entnommen wurde.

Überprüft man die Identität dieser 3 Fraktionen mit dem WILCOXON-Test, so ergibt sich mit einer Signifikanzwahrscheinlichkeit von

$$2\alpha < 0,05 \quad X_{SK_1} \neq X_{SK_2}, \quad X_{SK_1} \neq X_{SK_3} \quad \text{und} \quad X_{SK_2} = X_{SK_3}$$

(siehe Kapitel 4200). Zur Erklärung der signifikanten Erhöhung von SK<sub>1</sub> gegenüber SK<sub>2</sub> und SK<sub>3</sub> wird angenommen, daß durch die Gewebsverletzung bei der Entnahme cytoplasmatische MDH freigesetzt und in die Fraktion I mit eingeschwemmt wird.

Für den Vergleich mit Perilymphe, venösem Serum und Liquor cerebrospinalis wurde deshalb das arithmetische Mittel aus SK<sub>2</sub> und SK<sub>3</sub> eingesetzt.

Die Ursache dafür, daß die Aktivitäten in SK<sub>2</sub> und SK<sub>3</sub> höher sind als in SV, kann durch eine ständige Ausdiffusion der MDH aus der Zelle und einem möglicherweise damit verbundenen erhöhten Gehalt im Gewebswasser erklärt werden.

### (3230) Häufigkeitsverteilung

Bei Überprüfung der Normalverteilung mit dem  $\chi^2$ -Test ergab sich bei  $\nu = 9$  und  $\chi^2 = 95,3$   $2\alpha \ll 0,00050$ . Eine Normalverteilung ist damit auszuschließen.

### (3300) Ergebnisse beim venösen Serum (SV)

#### (3310) Stichprobe

Die Stichprobe umfaßte 50 Personen, die sich je zur Hälfte aus Männern und Frauen zusammensetzte. Das mittlere Alter der Männer betrug  $42,0 \pm 13,8$  Jahre, das der Frauen  $36,8 \pm 13,1$  Jahre.

Die Enzymaktivität bei den Männern war  $44,6 \pm 14,5$  int. m. E. und unterscheidet sich nicht signifikant von der der Frauen mit einem Wert von  $43,3 \pm 17,5$  int. m. E.

Die Stichprobe schließt 20 Otosklerose-Patienten ein. Ein Vergleich der Enzymaktivität im Serum otosklerosekranker Patienten mit derjenigen nicht otosklerosekranker ergab mit einer Signifikanzwahrscheinlichkeit von  $2\alpha < 0,05$  keinen Unterschied (siehe Kapitel 4200).

Der Versuch, eine Abhängigkeit der Enzymaktivität vom Alter festzustellen, führte bei einem Korrelationskoeffizienten von 0,18 bei den Männern und 0,15 bei den Frauen zu keiner statistisch gesicherten Verknüpfung. Wie bei der Perilymphe wurden deshalb auch hier sämtliche Werte zusammengekommen.

#### (3320) Mittelwert

Die Normalwerte finden sich in folgender Tabelle. Zum Vergleich sind einige recht widersprüchliche Werte aus der Literatur aufgeführt.

Tabelle 6 : MDH-Aktivität im venösen Serum

| N   | $\bar{X}$                      | Autor                         |
|-----|--------------------------------|-------------------------------|
| 50  | $43,5 \pm 15,7$                | eigene Untersuchungen         |
| 107 | $23,5 \pm 3,5 \text{ §}$       | ENGELHARDT-GÖLKEL et al. (13) |
| 8   | $37,3 \text{ §}$               | E. SCHMIDT et al. (37)        |
| 30  | $57,0 \pm 32,4$<br>(bei 37° C) | MERTEN, SOLBACH (25)          |
| 21  | $112 \pm 17$                   | HEYCK, LAUDAHN (18)           |
| 21  | $50,9 \pm 4,8 \text{ §}$       | STARK, IWANOV (40)            |
| 200 | $53,48 \pm 1,09$               | WICHMANN (45)                 |
| 89  | 74                             | HAUG, GATHOF (16)             |

§ Die Werte dieser Autoren wurden in int. m. E. umgerechnet.

#### (3330) Prüfung auf Normalverteilung

Mit  $\chi^2 = 16,856$  und  $\nu = 5$  kann auch hier von einer Normalverteilung nicht gesprochen werden. Da Alter und Geschlecht als Ursache für die schräge Verteilung nicht in Frage kommen (siehe oben), war noch an einen Hämolysegrad der Proben unter 0,5 % (ein größerer Gehalt läßt sich in der Kapillare erkennen) zu denken. Ein solcher dürfte aber auch ohne Einfluß auf die Enzymaktivität sein. Bei der Perilymphe wurde gezeigt, daß zwischen Blutgehalt bei geringfügigem Hämolysegrad und MDH-Aktivität keine Beziehung besteht. Das gleiche ist für SV zu vermuten.

#### (3400) Ergebnisse beim Liquor (L)

##### (3410) Stichprobe

Die Stichprobe umfaßte 50 nicht pathologisch veränderte Lumballiquores von Patienten verschiedenen Alters und Geschlechts. Das Material wurde in dankenswerter Weise von der Neurologischen Universitätsklinik und der Universitäts-Nervenklinik zur Verfügung gestellt.

##### (3420) Mittelwert

Die gefundenen Werte sind in Tabelle 7 verzeichnet. Als Mittelwert fand sich  $18,3 \pm 6,3$  int. m. E.

#### (3430) Prüfung auf Normalverteilung

Mit  $\chi^2 = 4,586$  und  $\nu = 5$  kann hier mit einer Signifikanzwahrscheinlichkeit von  $2\alpha \leq \begin{smallmatrix} 0,50 \\ 0,40 \end{smallmatrix}$  die Verteilung als normal bezeichnet werden.

(3500) Vergleich der Befunde

(3510) Vergleich der MDH-Aktivitäten in Perilymphe (P), Kapillars-  
serum (SK), venösem Serum (SV) und Liquor (L)

Zwei der vier Stichproben sind nicht normal verteilt. Aus diesem Grund-  
muß beim Vergleich der verteilungsfreie Rangtest nach WILCOXON  
herangezogen werden.

(3511) Vergleich der MDH-Aktivitäten von SV mit L

Nach dem WILCOXON-Test ergibt sich für die Stichproben (Umfang:  
 $N_{1(L)} = 50$  und  $N_{2(SV)} = 50$ ): die Rangsumme  $T_1 = 1381$ , der Erwartungs-

$$\text{wert } T_1 = \frac{N_1 (N_1 + N_2 + 1)}{2} = 2525, \text{ die Varianz } \sigma_{T_1}^2 = \frac{N_2 \cdot T_1}{12}$$

$$= 10520,83, \text{ der Prüfquotient } q = \frac{T_1 - T_1}{\sqrt{\sigma_{T_1}^2}} = -11,16 \text{ (Documenta$$

Geigy, Wissenschaftliche Tabellen, 6. Auflage, Seite 170, 23).

Daraus folgt mit einer Signifikanzwahrscheinlichkeit  $2\alpha \ll 0,05$ , daß  
die Aktivität im venösen Serum signifikant größer als im Liquor ist.

$$A_{SV} > A_L.$$

(Anmerkung: A bedeutet mittlere rechnerisch erhaltene Enzymaktivität).

(3512) Vergleich der MDH-Aktivitäten von SK mit SV.

Hierbei sind  $T_1 = 1956,5$ ,  $T_1 = 2775$ ,  $\sigma_{T_1}^2 = 13875$ ,  $q = -6,94$ ,  
 $N_1 = 50$ ,  $N_2 = 60$ .

Auch hier gilt mit einer Signifikanzwahrscheinlichkeit von  $2\alpha \ll 0,05$

$$A_{SK} > A_{SV}.$$

Da  $A_{SV} > A_L$ , folgt hieraus

$$A_{SK} > A_L.$$

(3513) Vergleich der Aktivitäten von P mit SK

Hier findet sich für  $N_1 = 50$  und  $N_2 = 60$ :  $T_1 = 3748,5$ ,  $T_1 = 2775$ .

$$\sigma_{T_1}^2 = 13875, \quad q = 8,26.$$

Damit ist mit einer Signifikanzwahrscheinlichkeit von  $2\alpha \ll 0,05$

$$A_P > A_{SK}.$$

Da  $A_{SK} > A_{SV}$  und  $A_{SK} > A_L$  folgt hieraus

$$A_P > A_L.$$

Somit ergibt sich für die Enzymaktivitäten in Perilymphe, Kapillars-  
serum, venösem Serum und Liquor die Beziehung

$$A_P > A_{SK} > A_{SV} > A_L.$$

(3520) Konzentrationsquotienten

Ein umfassenderes Bild über die mittleren Enzymaktivitäten der ein-  
zelnen Stichproben vermitteln die Quotienten der mittleren Aktivitäten.

Diese wurden gebildet und sind untenstehend aufgeführt.

| Quotient                            | Verhältnis |
|-------------------------------------|------------|
| $\frac{\bar{A}_P}{\bar{A}_{SK}}$    | 1,50       |
| $\frac{\bar{A}_{SK}}{\bar{A}_{SV}}$ | 1,45       |
| $\frac{\bar{A}_{SV}}{\bar{A}_L}$    | 2,38       |

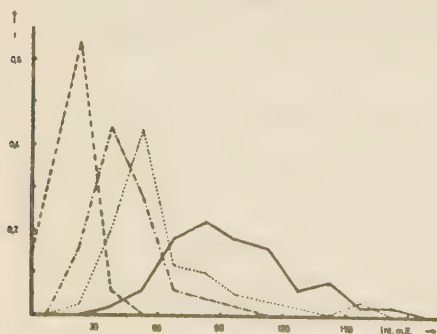
Durch entsprechende Multiplikation lassen sich leicht andere Kombinationen ermitteln. Von Bedeutung ist zum Beispiel diejenige zwischen Perilymphe und Liquor, die sich folgendermaßen berechnet

$$\frac{\bar{A}_P}{\bar{A}_L} = \frac{\bar{A}_P}{\bar{A}_{SK}} \cdot \frac{\bar{A}_{SK}}{\bar{A}_{SV}} \cdot \frac{\bar{A}_{SV}}{\bar{A}_L} = 1,50 \cdot 1,45 \cdot 2,38 = 5,18.$$

Der größte Konzentrationsquotient findet sich somit zwischen Perilymphe und Liquor, was gegen eine Entstehung der Perilymphe aus dem Liquor spricht. Näheres siehe Diskussion.

### (3530) Überlappungen

Noch weitergehenden Aufschluß über die Ähnlichkeit zweier Stichproben erhält man durch die Ermittlung der Überlappung der Verteilungskurven. Im Gegensatz zur Quotientenbildung der Mittelwerte wird hierbei auch die Streuung berücksichtigt. Unter Überlappung versteht man den relativen Anteil der Deckungsfläche zweier Kurven, der hier zwischen P und SV im Hinblick auf die MDH-Aktivität 20 % beträgt. Man addiert hierzu die niedrigsten relativen Häufigkeiten aller besetzten Klassen der beiden betrachteten Stichproben auf.



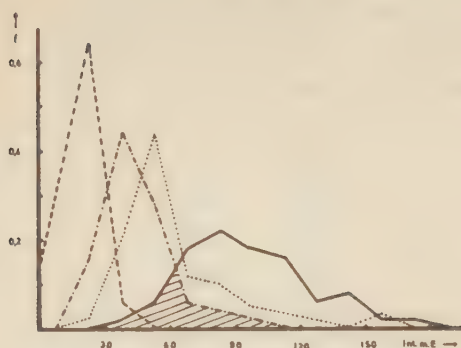


Abbildung 3: MDH-Aktivität in int.m.E. Verteilung der empirischen relativen Häufigkeit f. Klassenbreite 15 int.m.E., schraffiert: Überlappung zwischen P und SV.

|              |                  | $\bar{X}$ | s    | N  |
|--------------|------------------|-----------|------|----|
| Perilymphe   | —————            | 95,6      | 29,9 | 50 |
| Serum (kap.) | .....            | 63,5      | 27,9 | 60 |
| Serum (ven.) | -. - . - . - . - | 43,5      | 15,7 | 50 |
| Liquor       | -----            | 18,3      | 6,3  | 50 |

Abszisse: MDH-Aktivität

Ordinate: empirische relative Häufigkeit der Klasse

Zwischen Perilymphe, Kapillarserum, venösem Serum und Liquor fanden sich folgende prozentualen Überlappungen:

|    | P   | SK  | SV  | L   |
|----|-----|-----|-----|-----|
| P  | 100 | 42  | 20  | 2   |
| SK | 42  | 100 | 62  | 8   |
| SV | 20  | 62  | 100 | 22  |
| L  | 2   | 8   | 22  | 100 |

Das bedeutet zum Beispiel, daß bei Bestimmung der Enzymaktivitäten von 100 Kapillarseren sich 62 nicht von denjenigen im venösen Serum unterscheiden oder daß bei 100 Perilymphbestimmungen nur 2 Liquores gleiche Werte liefern.

Auch hierbei sind also Perilymphe und Liquor am meisten verschieden.

#### (4000) TABELLEN

=====

#### (4100) Meßwerte von P, SK, SV und L

-----

Tabelle 7: MDH-Aktivität in Perilymphe(P), venösem Serum(SV) und Liquor(L) in int. m. E.  
Nur Proben mit gleicher Chiffre entstammen dem gleichen Patienten.

| Patient | $\bar{A}_P$ | Patient | $\bar{A}_{SV}$ | Patient | $\bar{A}_L$ |
|---------|-------------|---------|----------------|---------|-------------|
| 11      | 92, 6       | 11      | 17, 1          | 13      | 21, 1       |
| 21      | 105, 9      | 21      | 51, 3          | 23      | 23, 6       |
| 31      | 66, 7       | 31      | 16, 3          | 33      | 13, 6       |
| 41      | 58, 5       | 41      | 47, 2          | 43      | 15, 2       |
| 51      | 79, 0       | 51      | 56, 2          | 53      | 34, 0       |
| 61      | 118, 9      | 61      | 40, 7          | 63      | 13, 6       |
| 71      | 63, 5       | 71      | 48, 9          | 73      | 19, 4       |
| 81      | 114, 0      | 81      | 35, 8          | 83      | 16, 3       |
| 91      | 98, 6       | 91      | 39, 1          | 93      | 17, 1       |
| 101     | 84, 7       | 101     | 33, 4          | 103     | 22, 0       |
| 111     | 79, 0       | 111     | 38, 3          | 113     | 20, 4       |
| 121     | 88, 8       | 121     | 38, 3          | 123     | 21, 2       |
| 131     | 90, 4       | 131     | 48, 1          | 133     | 7, 3        |
| 141     | 138, 1      | 141     | 42, 4          | 143     | 17, 1       |
| 151     | 79, 3       | 151     | 38, 3          | 153     | 17, 1       |
| 161     | 86, 0       | 162     | 18, 7          | 163     | 10, 6       |
| 171     | 44, 8       | 172     | 97, 8          | 173     | 16, 3       |
| 181     | 64, 8       | 182     | 49, 7          | 183     | 8, 1        |

Fortsetzung Tabelle 7

| Patient | $\bar{A}_P$ | Patient | $\bar{A}_{SV}$ | Patient | $\bar{A}_L$ |
|---------|-------------|---------|----------------|---------|-------------|
| 191     | 60, 1       | 192     | 65, 2          | 193     | 26, 1       |
| 201     | 57, 7       | 202     | 22, 8          | 203     | 15, 1       |
| 211     | 177, 6      | 212     | 29, 3          | 213     | 17, 1       |
| 221     | 69, 5       | 222     | 49, 7          | 223     | 11, 4       |
| 231     | 102, 2      | 232     | 47, 2          | 233     | 21, 1       |
| 241     | 106, 0      | 242     | 36, 7          | 243     | 22, 0       |
| 251     | 134, 3      | 252     | 60, 3          | 253     | 7, 3        |
| 261     | 81, 3       | 262     | 64, 4          | 263     | 26, 8       |
| 271     | 85, 4       | 272     | 35, 8          | 273     | 22, 4       |
| 281     | 95, 4       | 282     | 51, 3          | 283     | 13, 8       |
| 291     | 142, 6      | 292     | 28, 5          | 293     | 18, 3       |
| 301     | 99, 0       | 302     | 36, 7          | 303     | 20, 3       |
| 311     | 74, 2       | 312     | 37, 5          | 313     | 32, 5       |
| 321     | 63, 6       | 322     | 54, 6          | 323     | 10, 2       |
| 331     | 84, 8       | 332     | 83, 1          | 333     | 20, 9       |
| 341     | 147, 3      | 342     | 45, 6          | 343     | 16, 3       |
| 351     | 136, 7      | 352     | 81, 5          | 353     | 20, 9       |
| 361     | 118, 1      | 362     | 37, 5          | 363     | 15, 2       |
| 371     | 112, 4      | 372     | 41, 5          | 373     | 23, 2       |
| 381     | 115, 0      | 382     | 37, 5          | 383     | 13, 8       |
| 391     | 67, 7       | 392     | 35, 8          | 393     | 14, 2       |
| 401     | 130, 8      | 402     | 36, 7          | 403     | 14, 2       |
| 411     | 109, 4      | 412     | 45, 6          | 413     | 20, 3       |
| 421     | 163, 2      | 422     | 41, 5          | 423     | 15, 2       |
| 431     | 102, 0      | 432     | 44, 0          | 433     | 34, 9       |
| 441     | 64, 9       | 442     | 48, 9          | 443     | 19, 5       |
| 451     | 77, 0       | 452     | 53, 8          | 453     | 20, 9       |
| 461     | 92, 7       | 462     | 39, 1          | 463     | 19, 5       |
| 471     | 104, 8      | 472     | 27, 7          | 473     | 13, 6       |
| 481     | 79, 8       | 482     | 23, 6          | 483     | 13, 8       |
| 491     | 122, 4      | 492     | 35, 8          | 493     | 10, 6       |
| 501     | 46, 4       | 502     | 39, 1          | 503     | 29, 3       |

Tabelle 8: MDH-Aktivität im Kapillars Serum bei fraktionierter Entnahme ( $SK_1$ ,  $SK_2$ ,  $SK_3$ ). Enzymaktivität in int. m. E.

| Patient | $\bar{A}_{SK_1}$ | $\bar{A}_{SK_2}$ | $\bar{A}_{SK_3}$ | $\bar{A}_{SK_{\frac{2+3}{2}}}$ |
|---------|------------------|------------------|------------------|--------------------------------|
| 1       | -                | 65, 2            | 32, 6            | 48, 9                          |
| 2       | 38, 3            | 19, 6            | 29, 3            | 24, 5                          |
| 3       | 48, 1            | 43, 2            | 64, 4            | 53, 8                          |
| 4       | 52, 9            | 58, 7            | 35, 8            | 47, 2                          |
| 5       | 115, 7           | 75, 8            | 63, 5            | 69, 7                          |
| 6       | 76, 6            | 101, 8           | 66, 8            | 84, 3                          |
| 7       | 142, 6           | 104, 3           | 103, 5           | 103, 9                         |
| 8       | 27, 7            | 44, 0            | 17, 1            | 30, 6                          |
| 9       | 39, 1            | 26, 9            | 43, 2            | 35, 1                          |
| 10      | 42, 4            | 90, 4            | 36, 7            | 63, 6                          |
| 11      | 26, 9            | 43, 2            | 40, 7            | 42, 0                          |
| 12      | 45, 6            | 75, 8            | 52, 1            | 64, 0                          |
| 13      | 88, 0            | 119, 7           | 96, 1            | 107, 9                         |
| 14      | 31, 0            | 39, 1            | 40, 7            | 39, 9                          |
| 15      | 74, 9            | 57, 0            | 57, 0            | 57, 0                          |
| 16      | 120, 6           | 40, 7            | -                | 40, 7                          |
| 17      | 107, 5           | 26, 9            | 88, 0            | 57, 5                          |
| 18      | 66, 8            | 42, 4            | 34, 2            | 38, 3                          |
| 19      | 51, 3            | 43, 2            | 61, 1            | 52, 2                          |
| 20      | 59, 5            | 58, 7            | 52, 1            | 55, 4                          |
| 21      | 89, 6            | 51, 3            | 61, 1            | 56, 2                          |
| 22      | 161, 3           | 162, 9           | -                | 162, 9                         |
| 23      | 63, 5            | 51, 3            | 60, 3            | 55, 8                          |
| 24      | 116, 5           | 93, 7            | 89, 6            | 91, 7                          |
| 25      | 52, 9            | 40, 7            | 42, 4            | 41, 6                          |
| 26      | 74, 9            | 36, 7            | -                | 36, 7                          |
| 27      | 91, 2            | 55, 4            | 58, 7            | 57, 1                          |
| 28      | 100, 2           | 92, 9            | 83, 1            | 88, 0                          |
| 29      | 61, 1            | 58, 7            | 40, 7            | 49, 7                          |

Fortsetzung Tabelle 8:

| Patient | $\bar{A}_{SK_1}$ | $\bar{A}_{SK_2}$ | $\bar{A}_{SK_3}$ | $\bar{A}_{SK_{\frac{2+3}{2}}}$ |
|---------|------------------|------------------|------------------|--------------------------------|
| 30      | 56, 2            | 92, 0            | 111, 6           | 101, 8                         |
| 31      | 69, 2            | 82, 3            | 75, 8            | 79, 1                          |
| 32      | 104, 3           | 48, 9            | 51, 3            | 50, 1                          |
| 33      | 54, 6            | 49, 7            | 65, 2            | 57, 5                          |
| 34      | 57, 0            | 44, 0            | 31, 0            | 37, 5                          |
| 35      | 46, 4            | 73, 3            | 45, 6            | 59, 5                          |
| 36      | 97, 8            | 83, 9            | 69, 2            | 76, 6                          |
| 37      | 54, 6            | 56, 2            | 61, 1            | 58, 7                          |
| 38      | 100, 2           | -                | 81, 5            | 81, 5                          |
| 39      | 149, 9           | 161, 3           | 162, 9           | 162, 1                         |
| 40      | 69, 2            | 92, 9            | 81, 5            | 87, 2                          |
| 41      | 117, 3           | 105, 9           | 107, 5           | 106, 7                         |
| 42      | 59, 5            | 79, 0            | 29, 3            | 54, 2                          |
| 43      | 44, 8            | 79, 0            | 36, 7            | 57, 9                          |
| 44      | 69, 2            | 67, 6            | 38, 3            | 53, 0                          |
| 45      | 48, 9            | 51, 3            | 44, 8            | 48, 1                          |
| 46      | 55, 4            | 38, 3            | 55, 4            | 46, 9                          |
| 47      | 107, 5           | 39, 1            | 65, 2            | 52, 2                          |
| 48      | 55, 4            | 42, 4            | 104, 3           | 73, 4                          |
| 49      | 56, 2            | 66, 8            | 57, 0            | 61, 9                          |
| 50      | 88, 0            | 70, 9            | 60, 3            | 65, 5                          |
| 51      | 54, 6            | 49, 7            | 57, 0            | 53, 4                          |
| 52      | 42, 4            | 31, 8            | 73, 3            | 52, 6                          |
| 53      | 63, 5            | 70, 1            | 45, 6            | 57, 9                          |
| 54      | 92, 9            | 83, 1            | 171, 1           | 127, 1                         |
| 55      | 56, 8            | 41, 2            | -                | 41, 2                          |
| 56      | 61, 8            | 56, 0            | 25, 5            | 40, 8                          |
| 57      | 88, 2            | -                | 41, 2            | 41, 2                          |
| 58      | 76, 6            | 47, 0            | 42, 8            | 44, 9                          |
| 59      | 39, 5            | 55, 2            | 41, 2            | 48, 2                          |
| 60      | 97, 2            | 63, 4            | 71, 7            | 67, 6                          |

Fortsetzung Tabelle 8:

| Patient | $\bar{A}_{SK_1}$ |
|---------|------------------|
| 61      | 75, 8            |
| 62      | 65, 2            |
| 63      | 65, 2            |
| 64      | 93, 7            |
| 65      | 67, 6            |
| 66      | 42, 4            |
| 67      | 89, 6            |
| 68      | 52, 9            |
| 69      | 70, 9            |
| 70      | 74, 9            |
| 71      | 66, 8            |
| 72      | 60, 3            |
| 73      | 78, 2            |
| 74      | 63, 5            |

(400) Vergleich von Unterproben mit dem Rangtest von WILCOXON

Die Bedeutung der Symbole ist die gleiche wie in Kapitel 3500.

Vergleich von SV otosklerotisch (Stichprobe 1, 30 Werte) mit SV nicht otosklerotisch (Stichprobe 2, 20 Werte)

|             |                         |                               |
|-------------|-------------------------|-------------------------------|
| $N_1 = 20$  | $T_1 = 510$             | Stichprobe 1/Stichprobe 2 :   |
| $N_2 = 30$  | $\sigma_{T_1}^2 = 1275$ | Unterschied nicht signifikant |
| $T_1 = 492$ | $q = -0,504$            | $\alpha = 0,307$              |

Vergleich von  $SK_1$  (73 Werte) mit  $SK_2$  (58 Werte)

|                |                          |                         |
|----------------|--------------------------|-------------------------|
| $N_1 = 58$     | $T_1 = 3828$             | $\alpha = 0,0038$       |
| $N_2 = 73$     | $\sigma_{T_1}^2 = 23287$ | $SK_1/SK_2 :$           |
| $T_1 = 3419,5$ | $q = -2,67$              | Unterschied signifikant |

Vergleich von SK<sub>1</sub> mit SK<sub>3</sub> (56 Werte)

|                         |                                        |                                    |
|-------------------------|----------------------------------------|------------------------------------|
| N <sub>1</sub> = 56     | T <sub>1</sub> = 3640                  | α = 0,001                          |
| N <sub>2</sub> = 73     | σ <sub>r</sub> <sup>2</sup> = 22143,33 | SK <sub>1</sub> /SK <sub>3</sub> : |
| T <sub>1</sub> = 3108,5 | q = -3,57                              | Unterschied signifikant            |

Vergleich von SK<sub>2</sub> mit SK<sub>3</sub>

|                         |                                        |                                    |
|-------------------------|----------------------------------------|------------------------------------|
| N <sub>1</sub> = 56     | T <sub>1</sub> = 3220                  | α = 0,167                          |
| N <sub>2</sub> = 58     | σ <sub>r</sub> <sup>2</sup> = 15563,33 | SK <sub>2</sub> /SK <sub>3</sub> : |
| T <sub>1</sub> = 3099,5 | q = -0,965                             | Unterschied nicht signifikant      |

Vergleich von SK männlich (30 Werte) mit SK weiblich (25 Werte)

|                        |                      |                               |
|------------------------|----------------------|-------------------------------|
| N <sub>1</sub> = 25    | T <sub>1</sub> = 584 | SK männlich/SK weiblich:      |
| N <sub>2</sub> = 30    | T <sub>r</sub> = 816 | Unterschied nicht signifikant |
| T <sub>1</sub> = 691,5 | 2α = 0,05            |                               |

(5000) TIERVERSUCHE

-----  
(5100) Problemstellung

Bei Untersuchung der Fehlerquellen (siehe Kapitel 2235) stellte sich heraus, daß zwischen MDH-Aktivität in der Perilymphe und Operateur anscheinend gewisse Beziehungen existieren. Weiterhin hat sich gezeigt, daß die MDH-Aktivität von zwei Perilymphe aus nicht-otosklerotischen Ohren deutlich unter der des Mittelwerts lag (Kapitel 3121).

Da es bis jetzt weder theoretische noch praktische Anhaltspunkte gibt, daß die MDH-Aktivität der Perilymphe in otosklerosekranken Ohren höher sein soll als in gesunden, muß zunächst daran gedacht werden, daß sich der Aktivitätsunterschied möglicherweise in beiden Punkten durch ein verschieden großes Operationstrauma erklärt.

Diese Vermutung kann durch Tierexperimente abgesichert werden.

### (5200) Operationstechnik

Die anatomisch günstige Lage der Cochlea, welche die Perilymphgewinnung erleichtert, ließ das Meerschweinchen als Versuchstier geeignet erscheinen. Die verwendeten Tiere hatten meist ein Gewicht von 250 bis 400 g.

Als Basisnarkotikum diente eine intraperitoneal injizierte 25-%ige Urethanlösung (0,2 ml pro 100 g Körpergewicht). Die Vervollständigung der Narkose erfolgte mit Äther.

Die operative Freilegung der Cochlea geschieht in folgender Weise:

Vom unteren Rand des Unterkiefers führt man einen langen Hautschnitt bis zum Scheitel des Tieres. Die über dem Unterkieferwinkel verlaufenden Gefäße, die Ohrmuschel, Mittelohr, Parotis und die umliegende Muskulatur versorgen, werden unterbunden und durchtrennt. Nach Frakturierung des Unterkiefers mit einer kleinen Knochenzange etwa in der Mitte des horizontalen Astes kann mit dem Wundsperrerr ein übersichtliches Operationsfeld dargestellt werden. Anschließend wird die die Bulla tympanica bedeckende Muskulatur durchtrennt und abgeschoben. Gleichfalls wird etwa die Hälfte des Processus styloideus vorsichtig entfernt, um den darunterliegenden Venenplexus nicht zu verletzen. Nach Einschnneiden und Abschieben der die Bulla bedeckenden Fascie eröffnet man diese mit einem Bohrer und trägt die übrige Knochenwand soweit ab, bis der Zugang zu Cochlea und Stapes ausreichend ist.

Bis zu diesem Punkt kann mit bloßem Auge operiert werden. Das weitere Vorgehen erfolgt mit Hilfe des Operationsmikroskops.

Die auf der Schnecke oberflächlich liegenden feinen Gefäße werden mit einem feinen Wattetupfer weggewischt.

Zur Gewinnung einer Perilymphserie des 1. Typs wird mit einem spitz zulaufenden Bohrer oder einer feinen Nadel vorsichtig ein Loch in die Scala vestibuli der Basalwindung in unmittelbarer Nähe des Angulus zur

zweiten Windung gebohrt. Hierbei besteht nicht so sehr die Gefahr, die Reißnersche Membran zu verletzen. Nachdem das Loch gerade so tief ist, daß Perilymphe ausfließt, wird diese durch Anlegen einer Glaskapillare fraktioniert entnommen, und zwar Fraktion I unmittelbar nach dem Anbohren, Fraktion II nach 1 - 2 Minuten, Fraktion III nach 4 - 5 Minuten und Fraktion IV nach 10 - 15 Minuten. Die erhaltenen Probenmengen betrugen jeweils etwa 3 - 5  $\mu$ l. Weitere Einzelheiten der Operationstechnik finden sich bei RAUCH (31).

Zur Gewinnung einer Probenserie 2. Typs wird die Perilymphe aus dem ovalen Fenster entnommen. Hierzu luxiert man nach Durchtrennung des Amboß-Steigbügelgelenkes und des Musculus stapedius den Stapes in das Vestibulum und eröffnet dieses dadurch. Es wurden 6 Serien zu meist 3 - 4 Proben gewonnen.

Bei einer Perilymphserie 3. Typs wird der Steigbügel soweit in das Vestibulum gedrückt, daß er mit einem langen und dünnen Instrument an seinem einen Schenkel (beim rechten Ohr erfolgte dies im Uhrzeigersinn) um seine Längsachse bis in die weitestmögliche Endstellung rotiert werden kann. Sodann wurde in 10 Fällen je eine Probe aus dem Vestibulum entnommen.

Die Serie 4. Typs wird aus dem Vestibulum durch vorsichtiges Durchstechen des Ringbandes mit einer besonders feinen und spitzen Kapillare erhalten. Trotz leichter Kippung der Stapesfußplatte reißt das Ringband nicht in seiner ganzen Zirkumferenz ein.

#### (5300) Meßmethode

Die Messung der MDH-Aktivität erfolgte auf die gleiche Weise wie bei dem menschlichen Untersuchungsmaterial (siehe Kapitel 2100). Testansatz und Pipetten blieben unverändert. Die einzelnen Proben kamen nach Zentrifugation in den Kühlschrank und wurden innerhalb weniger Stunden gemessen.

(5400) MDH-Aktivität in der Perilymphe des Meerschweinchens

(5410) Ergebnisse bei den Perilymphe des 1. und 4. Typs

Die Mittelwerte beim 1. Typ mit den entsprechenden Streuungen sind in folgender Tabelle zusammengefaßt:

Tabelle 9: MDH-Aktivität bei fraktionierter Perilymphentnahme aus einem Bohrloch der Scala vestibuli

| Fraktion | N  | $\bar{X}$ | s    |
|----------|----|-----------|------|
| I        | 16 | 110,7     | 59,4 |
| II       | 16 | 77,6      | 49,8 |
| III      | 7  | 65,8      | 30,3 |
| IV       | 8  | 73,4      | 42,6 |

Mit dem WILCOXON-Test läßt sich zeigen (siehe Kapitel 6200), daß sich die vier Stichproben-Fraktionen nicht signifikant voneinander unterscheiden. Die Aktivitäten der MDH in den Fraktionen II, III und IV sind jedoch deutlich kleiner als in Fraktion I, wobei sich die Rangsummen mehr oder weniger den unteren Vertrauensgrenzen nähern. Werden die Fraktionen II, III und IV zusammengenommen, die Stichprobe damit vergrößert, und gemeinsam der Fraktion I gegenübergestellt, so ergibt sich ein signifikanter Unterschied. Aus diesem Grund erfolgte eine Zusammenfassung der Werte in zwei Gruppen:

Gruppe 1, die identisch mit Fraktion I ist und

Gruppe 2, in der die Fraktionen II, III und IV  
zusammengenommen sind.

In sechs Fällen erfolgte nach Abnahme von Fraktion II eine Luxation des Stapes auf die oben beschriebene Weise in das Vestibulum. Die Fraktionen III' und IV' aus dem Bohrloch der Scala vestibuli wurden dann zu den genannten Zeiten abgenommen. Mittelwert und Streuung sind:

Tabelle 10: Fraktion III' und IV' aus dem Bohrloch der Scala vestibuli nach Stapesluxation

| Fraktion | N  | $\bar{X}$ | s    |
|----------|----|-----------|------|
| III'     | 10 | 62,5      | 36,5 |
| IV'      | 4  | 52,2      | 8,8  |

Auch diese beiden Fraktionen III' und IV' waren statistisch nicht voneinander zu unterscheiden (siehe Kapitel 6200) und wurden deshalb zur Gruppe 3 zusammengefaßt.

Tabelle 11: Zusammensetzung der Gruppen

| Gruppe | Bestehend aus Fraktion | N  | $\bar{X}$ | s    |
|--------|------------------------|----|-----------|------|
| 1      | I                      | 16 | 110,7     | 59,4 |
| 2      | II, III, IV            | 31 | 73,9      | 43,2 |
| 3      | III', IV'              | 14 | 59,6      | 31,0 |

Gruppe 2 und 3 unterschieden sich bei Überprüfung mit dem WILCOXON-Test ebenfalls nicht (Kapitel 6200).

Der Unterschied zwischen Gruppe 1 und den Gruppen 2, 3 wird dadurch erklärt, daß in 1 durch den Bohreffekt MDH aus dem Knochengewebe ausgeschwemmt wird und in die Perilymphe gelangt. MOUHRABI (26) nimmt an, daß die erste Fraktion mehr oder weniger der reinen Perilymphe entspricht, während die nachfolgenden Fraktionen durch nachströmenden Liquor verdünnt werden sollen. Nach den eigenen Untersuchungen liegen jedoch die Werte, die man bei vorsichtiger Perilymph-entnahme durch das Ringband erhält (Fraktion II'' = Perilymphe des 4. Typs), eng bei denjenigen der Gruppen 2 und 3, weichen aber deutlich von 1 ab. Von einer merklichen Verdünnung durch nachströmenden Liquor kann deshalb nicht gesprochen werden. Dagegen spricht auch noch

die Beobachtung, daß bei vorsichtiger Entnahme Fraktion II'', die etwa 2 Minuten nach I'' entnommen wurde, höhere Werte als Fraktion I'' liefert.

Die Enzymaktivitäten in Fraktion I'' und II'' (Perilymphserie des 4. Typs) sind in folgender Tabelle zusammengestellt:

Tabelle 12: MDH-Aktivität bei vorsichtiger Perilymphentnahme durch das Ringband

| Fraktion | N  | $\bar{X}$ | s     |
|----------|----|-----------|-------|
| I''      | 10 | 67, 1     | 20, 9 |
| II''     | 5  | 129, 5    | 33, 1 |

#### (5420) Ergebnisse bei den Perilymphe des 2. Typs

In den 6 Fällen von Stapesluxation wurde die Fraktion I''' innerhalb der ersten 10 - 20 Sekunden, II''' nach 1 - 2 Minuten, III''' nach 4 - 5 Minuten und IV''' nach 10 - 15 Minuten aus dem Vestibulum entnommen. Die Mittelwerte mit ihren Streuungen sind:

Tabelle 13: MDH-Aktivität nach Stapesluxation bei Entnahme aus dem Vestibulum zu verschiedenen Zeiten

| Fraktion     | N  | $\bar{X}$ | s      |
|--------------|----|-----------|--------|
| I'''         | 6  | 400, 7    | 224, 7 |
| II'''        | 4  | 238, 2    | 93, 3  |
| III'''       | 6  | 344, 0    | 125, 6 |
| IV'''        | 4  | 335, 8    | 173, 0 |
| I''' - IV''' | 20 | 338, 2    | 164, 0 |

Die Fraktionen I''' bis IV''' waren bei Überprüfung mit dem WILCOXON-Test nicht voneinander unterscheidbar (siehe Kapitel 6200) und wurden deshalb zusammengefaßt.

(5430) Ergebnisse bei den Perilympen des 3. Typs

In 10 Fällen erfolgte nach Luxation des Stapes in das Vestibulum eine Drehung um seine Längsachse. Der Mittelwert hierzu beträgt  $\bar{X} = 278,7$  ( $s = 121,7$ ) int. m. E.

Diese Werte unterscheiden sich nicht signifikant von denjenigen, die sich nach reiner Stapesluxation fanden.

Ein eindeutiger Unterschied fand sich jedoch im Verhältnis zu den 10 vorsichtig durch das Ringband entnommenen Perilympen:

Tabelle 14: MDH-Aktivität in der Perilymphe bei Stapesluxation und bei vorsichtiger Entnahme durch das Ringband

| Entnahmeort | Entnahmemethode               | N  | $\bar{X}$ | s     |
|-------------|-------------------------------|----|-----------|-------|
| Vestibulum  | Stapesluxation mit Drehung    | 10 | 278,7     | 121,7 |
| "           | vorsichtig durch das Ringband | 10 | 67,1      | 20,9  |

(5440) Ergebnisse bei den Perilympen aus der Scala tympani

Bei zwei Meerschweinchen wurden durch ein Bohrloch in der Scala tympani der Basalwindung 5 Perilympen entnommen, die sich aus insgesamt 3 Fraktionen zusammensetzen. Wegen der geringen Anzahl wurden die Werte jedoch nicht verglichen, sondern zusammengekommen. Sie entsprechen den Werten der Gruppe 2 aus der Scala vestibuli.

Tabelle 15: MDH-Aktivität in Scala vestibuli und Scala tympani

| Entnahmeort               | N  | $\bar{X}$ | s    |
|---------------------------|----|-----------|------|
| Scala tymp.               | 5  | 75,5      | 23,4 |
| Scala vest.<br>(Gruppe 2) | 31 | 73,9      | 43,2 |

#### (5450) Zusammenfassung der bisherigen Ergebnisse der Tierversuche

Auf Grund der Tierversuche sind folgende Punkte festzuhalten:

- 1.) Bei sorgfältiger Entnahme der Perilymphe durch ein Bohrloch in der Scala vestibuli der basalen Schneckenwindung ist die MDH-Aktivität der Fraktion I gegenüber den zusammengefaßten nachfolgenden Fraktionen statistisch signifikant erhöht.
- 2.) Die Fraktionen II, III und IV entsprechen den Werten, die bei vorsichtiger Perilymphentnahme durch das Ringband hindurch erhalten werden.
- 3a) Bei einem Trauma im Bereich des ovalen Fensters, zum Beispiel einer Luxation des Stapes in das Vestibulum, ist die MDH-Aktivität der aus dem ovalen Fenster entnommenen Perilymphe stark erhöht.
- b) Bei Entnahme aus dem Bohrloch finden sich in diesen Fällen zunächst keine erhöhten Werte. Daraus ist folgender Schluß zu ziehen:
- c) Die Erhöhung der MDH-Aktivität in der Perilymphe des Vestibulums stammt aus der Nähe der Läsionsstelle. Als Ursprungsort dürfte besonders das Ringband mit dem darunterliegenden Endothel in Betracht kommen, die beide bei der genannten Manipulation zerreißen.
- 4.) Die 5 Perilymphe aus der Scala tympani entsprechen den Werten aus Gruppe 2. Es findet sich somit bezüglich der MDH-Aktivität kein signifikanter Aktivitätsunterschied zwischen Scala tympani und Scala vestibuli bei den beiden betrachteten Stichproben.

#### (5500) Versuche zur Ermittlung der Sedimentationskonstante $S_{20w}$ der MDH in der Meerschweinchenperilymphe

##### (5510) Problemstellung

Im Hinblick auf die bei Stapesluxation vermehrt gefundene MDH-Aktivität in der Perilymphe ist es von Interesse, ob es sich nur um die Vermehrung der zuvor vorhandenen MDH handelt oder ob sich zusätzlich eine von dieser unterscheidende MDH-Moleküart gebildet hat.

Die geringen verfügbaren Perilymphmengen führen zu erheblichen Schwierigkeiten bei der Bestimmung von MDH-Isozymen über chromatographische und elektrophoretische Verfahren.

Obwohl die Ultrazentrifugation in Kapillaren umstritten ist (2), bietet sie dennoch eine Möglichkeit, Moleküle verschiedenen Gewichts zu trennen und außerdem in erster Näherung ein Maß für deren Größe, das heißt Sedimentationskonstante, zu gewinnen. Die Zentrifugation in der Kapillare hat den Vorteil, daß störende Konvektionsströmungen vermieden werden und die Proben sich durch Zerschneiden der Kapillare in Segmente leicht gewinnen lassen. Sie hat den Nachteil, daß die unkontrollierbare Fortbewegung der Sedimentationsfront an der Phasengrenze stärker ins Gewicht fällt und die Segmente relativ groß gewählt werden müssen. Daß diese Methode prinzipiell erlaubt, zu Informationen über die qualitative und quantitative Zusammensetzung der Isozyme zu kommen, soll in folgenden orientierenden Versuchen kurz dargelegt werden.

#### (5520) Methode

In Glaskapillaren mit einem inneren Hohlquerschnitt von  $0,125 \pm 0,034 \text{ mm}^2$ , das heißt einem inneren Durchmesser von etwa 0,4 mm und der Wandstärke 0,1 - 0,05 mm werden etwa  $3,25 \mu\text{l}$  einer 0,145 n NaCl-Lösung und anschließend  $0,93 \mu\text{l}$  der zu untersuchenden MDH-haltigen Probe aufgezogen. Hierbei soll zwischen beiden Flüssigkeiten eine kleine Luftblase sein, um eine Durchmischung zu verhindern.

Stoßen die Flüssigkeitsgrenzen Probe-NaCl-Lösung aneinander und wird angenommen, daß beide dieselbe Viskosität besitzen, so führt die Aspiration zu einer beträchtlichen Vermischung. Über das Hagen-Poiseuillesche Gesetz abgeleitet, wäre das Mischungsverhältnis NaCl : Probe in L mm Abstand vom Kapillaranfang und bei L' mm aufgezogener Probe

$$\frac{C_{\text{NaCl}}}{C_{\text{Probe}}} = \frac{L}{2L' - L}$$

Die mittlere gesamte Fadenlänge beträgt dabei etwa 33,5 mm, wovon annähernd 7,5 mm auf die Probe entfallen. Nach vorsichtigem Abschmelzen des freien ungefüllten Endes der Kapillare wird die Flüssigkeit bei etwa 2000 g nach unten geschleudert, wobei eine eventuell durch Aspiration gemachte Vermischung teils rückgängig, durch aufsteigende Blasen andererseits aber vermehrt wird.

Bei geringem Kapillarquerschnitt kommt es zu einer vernachlässigbaren Mischung beider Zonen. Die visuelle Kontrolle durch eine Methylenblau-Standardlösung ergab folgendes:

Tabelle 16: Verlängerung der Probensäule durch Vermischung (mm) in Abhängigkeit vom Kapillarquerschnitt (mm<sup>2</sup>)

| Querschnitt | Verlängerung der Probensäule<br>durch Vermischung |
|-------------|---------------------------------------------------|
| 0,09        | 0,3                                               |
| 0,10        | 0,6                                               |
| 0,12        | 0,4                                               |
| 0,20        | 0,9                                               |
| 0,24        | 1,2                                               |
| 0,26        | 1,5                                               |
| 0,41        | 2,5                                               |

das heißt es ergibt sich in engem Bereich eine nahezu lineare Abhängigkeit der absoluten Zonenverbreiterung vom Kapillarquerschnitt. Sie kann annäherungsweise wiedergegeben werden durch die Gleichung  $y = 6,65x - 0,3$  (Anmerkung:  $y$  = Verlängerung der Probensäule,  $x$  = Querschnitt).

Bei den verwendeten Probemengen ist hiernach mit einer etwa 7 %igen Verbreiterung der Auftragszone zu rechnen.

Anschließend wird das obere Ende abgeschmolzen, da bei den geringen Mengen ein entstehender Unterdruck im Zentrifugierbecher zu viel größeren relativen Verlusten führen kann. Nach zweistündiger Zentri-

fugation in einer MSE Superspeed 50 TC bei 40000 Umdrehungen/Minute in einem 3 x 5 ml Ausschwingrotor ( $t \sim 20^{\circ}\text{C}$ ,  $g_{\text{max}} = 237 \cdot 10^3 g$ ) werden die Kapillaren entnommen, durch Abschneiden in 5 Segmente geteilt und die MDH-Konzentration jeden Segmentes bestimmt.

Technisch wird so verfahren, daß der Testansatz BOEHRINGER in einer doppelt gewinkelten Glaskapillare 5 Minuten inkubiert wird. Anschließend setzt man das noch volle Segment in die Kapillare und schleudert den Inhalt zu, wobei das leere Rohrstück im Knick hängen bleibt. Nach Durchschütteln kann die Probe in einer Mikroküvette vermessen werden. Die MDH-Aktivität pro Volumeneinheit in den einzelnen Segmenten erhält man über das unter dem Mikroskop bestimmte Probevolumen (die Flüssigkeitsmenge des Ansatzes ist bekannt).

Da von Probe zu Probe verschieden hohe MDH-Aktivität vorhanden ist, die Gesamtmenge für die Bestimmung der Sedimentationskonstante jedoch ohne Bedeutung bleibt, wurde zur Auswertung der Messung auf eine Gesamtaktivität = 100 normiert. Trägt man diese relative Aktivität in den einzelnen Segmenten gegen die Distanz vom Rotationszentrum auf, so zeigt sich, daß die Aktivität der MDH als Folge der Zentrifugation radial wandert (Abb. 4).

#### (5530) Befunde bei der Meerschweinchenperilymphe

Tabelle 17 veranschaulicht die Ergebnisse.  $r$  bezeichnet den Abstand Segmentmitte - Rotationszentrum,  $A_{\text{eff}}$  die effektive MDH-Aktivität,  $A_{100}$  die auf eine Gesamtaktivität von 100 bezogenen Aktivitätswerte.

Tabelle 17: MDH-Aktivität in den einzelnen Segmenten.

I : vorsichtig durch das Ringband entnommene Perilymphe,

II: Entnahme nach Stapesluxation

Tier 1 (I)

| r    | A <sub>eff</sub> | A <sub>100</sub> |
|------|------------------|------------------|
| 58,3 | 16,8             | 9,8              |
| 65,2 | 35,6             | 20,7             |
| 71,8 | 9,3              | 5,4              |
| 77,9 | 26,3             | 15,3             |
| 84,4 | 84,0             | 48,8             |
| 90,7 | --               | 0                |

Tier 1 (II)

| r    | A <sub>eff</sub> | A <sub>100</sub> |
|------|------------------|------------------|
| 65,2 | 5,4              | 2,0              |
| 71,6 | 27,3             | 10,0             |
| 77,0 | 67,2             | 24,6             |
| 82,7 | 172,0            | 63,3             |
| 89,9 | -                | 0                |

Tier 2 (I)

| r    | A <sub>eff</sub> | A <sub>100</sub> |
|------|------------------|------------------|
| 62,0 | 18,5             | 6,6              |
| 67,9 | 40,0             | 14,3             |
| 93,5 | 42,8             | 15,3             |
| 70,6 | 35,1             | 12,5             |
| 85,7 | 63,2             | 22,5             |
| 91,3 | 80,7             | 28,8             |

Tier 2 (II)

| r    | A <sub>eff</sub> | A <sub>100</sub> |
|------|------------------|------------------|
| 70,0 | 23,3             | 12,9             |
| 76,0 | 46,2             | 25,6             |
| 80,9 | 16,5             | 9,1              |
| 85,5 | 30,0             | 16,6             |
| 90,9 | 64,9             | 35,9             |

Tier 3 (I)

| r    | A <sub>eff</sub> | A <sub>100</sub> |
|------|------------------|------------------|
| 72,6 | 11,2             | 5,3              |
| 78,0 | 28,2             | 13,2             |
| 82,9 | 51,5             | 24,2             |
| 87,6 | 51,1             | 24,0             |
| 91,9 | 71,6             | 33,2             |

Tier 3 (II)

| r    | A <sub>eff</sub> | A <sub>100</sub> |
|------|------------------|------------------|
| 69,6 | 18,6             | 11,9             |
| 74,7 | 38,1             | 24,2             |
| 80,1 | 99,7             | 63,7             |
| 85,6 | 0                | 0                |
| 91,1 | 0                | 0                |

Von 6 untersuchten Perilymphphen zeigen 4 zwei Zonen, die anderen nur eine (siehe Abbildung 4). Hiervon liegt die mit kleinerer Sedimentationskonstante in relativ geringer Konzentration vor.

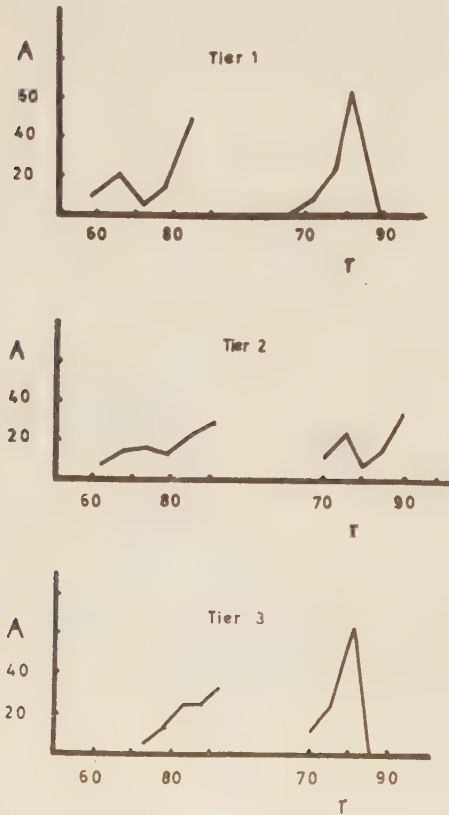


Abbildung 4: Abhängigkeit der MDH-Aktivität A in int. m. E. vom Abstand r (Rotationszentrum - Segmentmitte in mm)

Nach der Formel  $S_{20w} = \frac{\frac{X_2 - X_1}{t_2 - t_1}}{w^2 \frac{X_1 + X_2}{2}}$  (28) läßt sich daraus die

Sedimentationskonstante abschätzen.

Hierbei ist  $X_2$  die Distanzmitte des Segments höchster Enzymaktivität vom Rotationszentrum,  $X_1$  die Distanzmitte des Meniskussegments vom Rotationszentrum. Da es sich nur um eine Abschätzung von  $S_{20w}$  in erster Näherung handelt, kann vernachlässigt werden, daß das 1. Segment nicht völlig identisch ist mit der eingefüllten Probe.  $t_2 - t_1$  ist die Zentrifugationsdauer in Sekunden. Sie wird durch Brems- und Beschleunigungszeit unwesentlich verkürzt. Untenstehendes Diagramm zeigt die Zeitabhängigkeit der Umdrehungszahl/min. beim Beschleunigungs- und Bremsvorgang. Für beide ergab sich eine Zeitdauer von etwa 300 Sekunden. Ihr Äquivalent auf  $4 \cdot 10^4$  Umdrehungen/min. bezogen beträgt näherungsweise nach der Formel (bei Annahme von Impulsidentität):

$$t = \frac{\left( u_0 / \text{min} + \frac{\Delta u / \text{min}}{\Delta t} \right)^3}{3 \left( \frac{\Delta u / \text{min}}{\Delta t} \right) \cdot u_E^2} \bigg|_0^t$$

Anmerkung:  $U_0$  ist eine fiktive Größe wegen der linearen Darstellung von  $U$  als  $f(t)$ .

$\frac{\Delta U}{\Delta t}$  Zunahme der Umdrehungszahl pro Zeiteinheit

100 Sekunden, so daß von der Gesamtzeit 200 Sekunden in Abzug zu bringen sind. Bei den Fehlern der Methode bringt diese Korrektur von 2,8 % keine wesentliche Verbesserung.

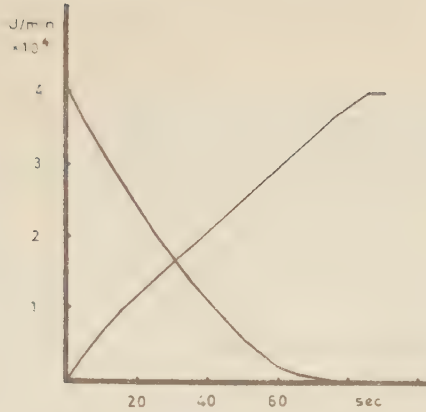


Abbildung 5: Beschleunigungs- und Bremsdiagramm der Superspeed 50 TC mit 3 x 5 ml Ausschwingrotor

$w$  ist die Winkelgeschwindigkeit 2 .U/s.

Damit wird  $S_{20w} = \frac{X_2 - X_1}{X_2 + X_1} \cdot k$  mit  $k = 1,628 \cdot 10^{-11}$ .

Die Ergebnisse sind in Tabelle 18 dargestellt. Wurde die höchste Konzentration im Bodensegment gefunden, so ist dies durch das Größerzeichen  $S_{20w} >$  gekennzeichnet. Anderenfalls steht das Zeichen  $\sim$ .

Tabelle 18:  $S_{20w}$  bei den Perilymphmen der drei Versuchstiere

|             | Zone I<br>$S_{20w}$ | Zone II<br>$S_{20w}$ |
|-------------|---------------------|----------------------|
| Tier 1 (I)  | 9,09                | ~ 29,77              |
| Tier 1 (II) | -                   | ~ 17,62              |
| Tier 2 (I)  | 13,82               | > 31,13              |
| Tier 2 (II) | 6,64                | > 21,15              |
| Tier 3 (I)  | 10,78               | > 19,09              |
| Tier 3 (II) | -                   | ~ 18,36              |

Aus diesen Versuchen hat sich ergeben, daß offenbar 2 Typen der MDH-Isozyme vorliegen, wobei der 1. Typ mit einer Sedimentationskonstante von  $\bar{X} \approx 10$  ( $s \approx 3$ ) in geringer, der 2. Typ mit  $\bar{X} \approx 23$  ( $s \approx 6$ ) in höherer Konzentration (in einigen Proben ist das Verhältnis etwa 2 : 1) vorliegt. Diese Befunde stehen in Einklang mit dem Ergebnis einer ebenfalls orientierenden elektrophoretischen Vergleichsuntersuchung, wo sich auch ein dominierendes Isozym findet.

(5600) Versuche zur elektrophoretischen Auftrennung der MDH-Isozyme in der Perilymphe

Im Gegensatz zu der Ultrazentrifugationsmethode werden hierbei wesentlich größere Perilymphmengen benötigt. Eine deutlich sichtbare Anfärbung mit Tetrazoliumsalzen erhält man erst bei Verwendung von etwa 5  $\mu$ l Perilymphe und mehrstündiger Inkubation.

(5610) Methode

Zur Eignung als Trägerschicht wurden Cellogel (Streifen der Firma SERVA) und Agarose-Gel, das nach einem von K. A. JENSEN und T. LAURSEN angegebenen Verfahren (20) hergestellt wurde, überprüft. Obgleich die Schicht der käuflichen Streifen homogener ist, wurden mit den selbst hergestellten Platten die besseren Ergebnisse erzielt. Als

Elektrolyt erwies sich ein 41,2 mM Barbitalpuffer von etwa pH 8,4 als geeignet.

Das Auftragen der Probe erfolgt zweckmäßig so, daß mit einem Filterpapierstreifen an der Auftragsstelle überschüssige Flüssigkeit abgesaugt und dadurch eine Mulde erzeugt wird. In diese trägt man die Probe ein. Anschließend werden die Proteine durch zweistündiges Einwirken eines Spannungsgefälles von etwa 20 - 25 Volt/cm elektrophoretisch aufgetrennt. Danach folgt die Anfärbung mit Lösungen folgender Zusammensetzung:

- A. bei pH 8,6: 1.) 0,3 ml Methylphenaziniummethosulfat-Lösung (1mg/ml Wasser)  
2.) 3 ml Nitro BT (1 mg/ml Wasser)  
3.) 2 ml NAD-NADP (5 mg/ml in einer Äpfelsäure-Tetraborat-Lösung).

Die Äpfelsäure-Tetraborat-Lösung hat folgende Zusammensetzung:

2,65 Mol/l Kalium-Malat und

0,53 Mol/l Kalium-Tetraborat

- B. bei pH 7,4: zur Anfärbung im niedrigeren pH-Bereich wird Tetraborat nicht mehr benötigt. Deshalb kann NAD-NADP in reiner Malatlösung aufgenommen werden.

Mit HCl bzw. KOH wird die Lösung auf einen pH von 8,6 beim Testserum, von 7,4 bei der Perilymphe eingestellt. Damit werden die Plättchen über Nacht im Dunkeln in einer feuchten Kammer bei 50° C inkubiert.

Die Zusammensetzung der Färbelösung erfolgt in Anlehnung an Arbeiten von H. BARNETT (1) und S. MARGHESCU (23).

#### (5620) Ergebnisse

Unter den vorgegebenen Pufferbedingungen erfolgte die Wanderung der MDH bzw. ihrer Isozyme in der Perilymphe genau so wie in den zum Vergleich herangezogenen Kapillarseren kathodisch. Während beim

Human-Kapillarserum 2 Fraktionen zu erkennen sind, zeigt sich in der Meerschweinchen-Perilymphe nach Stapesluxation nur eine Fraktion deutlich. Die andere kann sich unter dem Bandenausläufer verbergen. In der vorsichtig entnommenen Perilymphe findet sich nur andeutungsweise eine Fraktion in sehr geringer Konzentration.

Die Anfärbung der Serum-MDH-Isozyme ist sowohl bei pH 8,6 wie bei pH 7,4 möglich. Im alkalischen Bereich scheint die Anfärbung besser zu sein. Umgekehrt erhält man bei der Perilymph-MDH die bessere Anfärbbarkeit bei pH 7,4.

Aus der Literatur ist bekannt (23, 36), daß die C-MDH anodisch, die M-MDH kathodisch wandert. Daraus müßte mit der Zusatzannahme, daß bei einer eventuellen Ionenumladung durch pH-Veränderung die C-MDH sicher weniger weit kathodenwärts wandert als die M-MDH, gefolgert werden, daß bei Stapesluxation vorwiegend C-MDH entsteht. Eine weitere Stütze für diese Annahme ist die höhere Aktivität, die sich in dieser Zone findet, da andere Untersucher zeigen konnten, daß das Aktivitätsverhältnis meist zugunsten der C-MDH verschoben ist (siehe Kapitel 1300).

Die nachstehende Abbildung zeigt die Pherogramme von Meerschweinchenperilymphe nach Stapesluxation und Humanserum bei einem pH von jeweils 7,4.

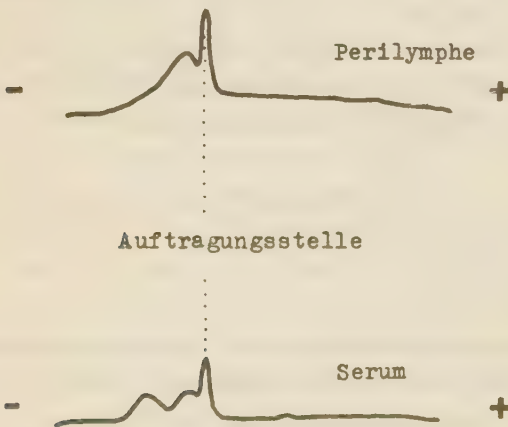


Abbildung 6: Erklärung siehe Text

(6000) TABELLEN

=====

(6100) Meßwerte der Tierversuche

Tabelle 19: Einzelwerte der MDH-Aktivität in den verschiedenen Fraktionen (Bedeutung der Symbole siehe Kapitel 5400)

| Tier | Fraktion |       |       |       |       |      |
|------|----------|-------|-------|-------|-------|------|
| Nr.  | I        | II    | III   | IV    | III'  | IV'  |
| 1    | 109,7    | 41,6  | 83,1  | 78,1  |       |      |
| 2    | 50,7     | 113,1 | 39,9  | 157,9 |       |      |
| 3    | 52,8     | -     | -     | 51,2  |       |      |
| 4    | 57,7     | 44,8  | 38,9  | 37,7  |       |      |
| 5    | 46,4     | 42,7  | 54,7  | 62,1  |       |      |
| 6    | 165,1    | -     | 93,7  | 114,1 |       |      |
| 7    | -        | 163,2 | 112,2 | 51,0  |       |      |
| 8    | 223,5    | 67,7  | 38,0  | 35,2  |       |      |
| 10   | 123,4    | 38,0  |       |       | 145,6 |      |
| 11   | 117,8    | 41,7  |       |       | 37,1  | 39,9 |
| 12   | 77,0     | 55,7  |       |       | 49,2  | 57,5 |
| 13   |          |       |       |       | 20,4  |      |
| 14   |          | 64,9  |       |       | 79,8  | 59,4 |
| 15   | 158,6    | 64,9  |       |       | 27,8  |      |
| 16   |          |       |       |       |       | 51,9 |
| 17   | 110,4    | 111,3 |       |       | 71,4  |      |
| 18   | 37,1     | 39,9  |       |       | 69,6  |      |
| 19   | 97,4     | 79,8  |       |       | 41,7  |      |
| 20   | 114,1    | 59,4  |       |       |       |      |
| 21   | 229,1    | 213,3 |       |       | 82,5  |      |

Fortsetzung Tabelle 19:

| Tier |        | Fraktion |        |        |  |
|------|--------|----------|--------|--------|--|
| Nr.  | I'''   | II'''    | III''' | IV'''  |  |
| 9    | 331, 1 | -        | 308, 9 | 521, 3 |  |
| 10   | 651, 1 | 317, 2   | 576, 9 | -      |  |
| 11   | 209, 6 | -        | 374, 7 | -      |  |
| 12   | 662, 2 | 228, 2   | 231, 9 | 434, 1 |  |
| 14   | 119, 6 | 110, 4   | 246, 7 | 245, 8 |  |
| 16   | 430, 4 | 296, 8   | 324, 6 | 141, 9 |  |

| Tier |        | Fraktion |        |  |
|------|--------|----------|--------|--|
| Nr.  | I''    | II''     | Rotat. |  |
| 17   | 64, 9  | 139, 1   |        |  |
| 18   | 40, 8  | 120, 6   |        |  |
| 19   | 120, 6 | 97, 4    |        |  |
| 20   | 74, 2  | 108, 5   | 474, 9 |  |
| 21   | 67, 7  | 181, 8   | 303, 3 |  |
| 22   |        |          | 392, 3 |  |
| 23   | 62, 1  |          | 152, 1 |  |
| 24   | 56, 6  |          | 147, 5 |  |
| 25   |        |          | 294, 9 |  |
| 26   |        |          | 429, 4 |  |
| 27   | 65, 9  |          | 234, 7 |  |
| 28   | 53, 8  |          | 218, 9 |  |
| 29   | 64, 0  |          | 139, 1 |  |

Zusammenfassung der Meßergebnisse

| Entnahmeort     | Entnahmemethode                               | N  | $\bar{X}$ | s      | Fraktion <sup>+) )</sup> |
|-----------------|-----------------------------------------------|----|-----------|--------|--------------------------|
| Scala vestibuli | Bohrloch                                      | 16 | 110, 7    | 59, 4  | I                        |
| "               | "                                             | 16 | 77, 6     | 49, 8  | II                       |
| "               | "                                             | 7  | 65, 8     | 30, 3  | III                      |
| "               | "                                             | 8  | 73, 4     | 42, 6  | IV                       |
| "               | " nach Stapes-<br>luxation                    | 10 | 62, 5     | 36, 5  | III'                     |
|                 |                                               | 4  | 52, 2     | 8, 8   | IV'                      |
| Scala tympani   | Bohrloch                                      | 5  | 75, 5     | 23, 4  |                          |
| Vestibulum      | Stapesluxation                                | 6  | 400, 7    | 224, 7 | I''                      |
| "               | "                                             | 4  | 238, 2    | 93, 3  | II'''                    |
| "               | "                                             | 6  | 344, 0    | 125, 6 | III'''                   |
| "               | "                                             | 4  | 335, 8    | 173, 0 | IV'''                    |
| Vestibulum      | Stapesluxation<br>und Drehung                 | 10 | 278, 7    | 121, 7 |                          |
| Vestibulum      | vorsichtige<br>Entnahme durch<br>das Ringband | 10 | 67, 1     | 20, 9  | I''                      |
|                 |                                               | 5  | 129, 5    | 33, 1  | II''                     |

+) )

| Fraktion                                 |          | N  | $\bar{X}$ | s      |
|------------------------------------------|----------|----|-----------|--------|
| I }<br>II }<br>III }<br>IV }             | Gruppe 1 | 16 | 110, 7    | 59, 4  |
| III' }<br>IV' }                          | Gruppe 2 | 31 | 73, 9     | 43, 2  |
| III' }<br>IV' }                          | Gruppe 3 | 14 | 59, 6     | 31, 0  |
| I''' }<br>II''' }<br>III''' }<br>IV''' } |          | 20 | 338, 2    | 164, 0 |

(6200) Vergleich verschiedener Stichproben von Meerschweinchen-  
perilymphe mit dem Rangsummentest von WILCOXON

Die Bedeutung der Symbole ist die gleiche wie in Kapitel (5400)

Vergleich von Fraktion I (16 Fälle) mit Fraktion II (16 Fälle)

|             |                  |                               |
|-------------|------------------|-------------------------------|
| $N_1 = 16$  | $T_1 = 211$      | Fraktion I/Fraktion II:       |
| $N_2 = 16$  | $T_r = 317$      | Unterschied nicht signifikant |
| $T_1 = 311$ | $2\alpha = 0,05$ |                               |

Vergleich von Fraktion I (16 Werte) mit Fraktion III (7 Werte)

|            |                  |                               |
|------------|------------------|-------------------------------|
| $N_1 = 7$  | $T_1 = 54$       | Fraktion I/Fraktion III:      |
| $N_2 = 16$ | $T_r = 144$      | Unterschied nicht signifikant |
| $T_1 = 56$ | $2\alpha = 0,05$ |                               |

Vergleich von Fraktion I (16 Werte) mit Fraktion IV (8 Werte)

|              |                  |                               |
|--------------|------------------|-------------------------------|
| $N_1 = 8$    | $T_1 = 67$       | Fraktion I/Fraktion IV:       |
| $N_2 = 16$   | $T_r = 133$      | Unterschied nicht signifikant |
| $T_1 = 75,5$ | $2\alpha = 0,05$ |                               |

Vergleich von Fraktion II (16 Werte) mit Fraktion III (7 Werte)

|            |                  |                               |
|------------|------------------|-------------------------------|
| $N_1 = 7$  | $T_1 = 54$       | Fraktion II/Fraktion III:     |
| $N_2 = 16$ | $T_r = 114$      | Unterschied nicht signifikant |
| $T_1 = 74$ | $2\alpha = 0,05$ |                               |

Vergleich von Fraktion II (16 Werte) mit Fraktion IV (8 Werte)

|            |                  |                               |
|------------|------------------|-------------------------------|
| $N_1 = 8$  | $T_1 = 67$       | Fraktion II/Fraktion IV:      |
| $N_2 = 16$ | $T_r = 133$      | Unterschied nicht signifikant |
| $T_1 = 95$ | $2\alpha = 0,05$ |                               |

Vergleich von Fraktion III mit Fraktion IV

|            |                  |                               |
|------------|------------------|-------------------------------|
| $N_1 = 7$  | $T_1 = 38$       | Fraktion III/Fraktion IV:     |
| $N_2 = 8$  | $T_r = 74$       | Unterschied nicht signifikant |
| $T_1 = 56$ | $2\alpha = 0,05$ |                               |

Vergleich von Gruppe 1 (16 Werte) mit Gruppe 2 (31 Werte)

|               |                  |                                               |
|---------------|------------------|-----------------------------------------------|
| $N_1 = 16$    | $T_1 = 296$      | Gruppe 1/Gruppe 2:<br>Unterschied signifikant |
| $N_2 = 31$    | $T_r = 472$      |                                               |
| $T_1 = 483,5$ | $2\alpha = 0,05$ |                                               |

Vergleich von Gruppe 2 (31 Werte) mit Gruppe 3 (14 Werte)

|               |                  |                                                     |
|---------------|------------------|-----------------------------------------------------|
| $N_1 = 14$    | $T_1 = 242$      | Gruppe 2/Gruppe 3:<br>Unterschied nicht signifikant |
| $N_2 = 31$    | $T_r = 402$      |                                                     |
| $T_1 = 286,5$ | $2\alpha = 0,05$ |                                                     |

Vergleich von Fraktion III' (10 Werte) mit Fraktion IV' (4 Werte)

|            |                  |                                                              |
|------------|------------------|--------------------------------------------------------------|
| $N_1 = 4$  | $T_1 = 15$       | Fraktion III'/Fraktion IV':<br>Unterschied nicht signifikant |
| $N_2 = 10$ | $T_r = 45$       |                                                              |
| $T_1 = 28$ | $2\alpha = 0,05$ |                                                              |

Vergleich von Fraktion I''' (6 Werte) mit II''' (4 Werte)

|            |                  |                                                                |
|------------|------------------|----------------------------------------------------------------|
| $N_1 = 4$  | $T_1 = 12$       | Fraktion I'''/Fraktion II''':<br>Unterschied nicht signifikant |
| $N_2 = 6$  | $T_r = 32$       |                                                                |
| $T_1 = 16$ | $2\alpha = 0,05$ |                                                                |

Vergleich von Fraktion I''' mit III''' (6 Werte)

|            |                  |                                                                 |
|------------|------------------|-----------------------------------------------------------------|
| $N_1 = 6$  | $T_1 = 26$       | Fraktion I'''/Fraktion III''':<br>Unterschied nicht signifikant |
| $N_2 = 6$  | $T_r = 52$       |                                                                 |
| $T_1 = 36$ | $2\alpha = 0,05$ |                                                                 |

Vergleich von Fraktion I''' mit IV''' (4 Werte)

|            |                  |                                                                |
|------------|------------------|----------------------------------------------------------------|
| $N_1 = 4$  | $T_1 = 12$       | Fraktion I'''/Fraktion IV''':<br>Unterschied nicht signifikant |
| $N_2 = 6$  | $T_r = 32$       |                                                                |
| $T_1 = 21$ | $2\alpha = 0,05$ |                                                                |

Vergleich von Fraktion II''' mit III''':

|            |                  |                                                                  |
|------------|------------------|------------------------------------------------------------------|
| $N_1 = 4$  | $T_1 = 12$       | Fraktion II'''/Fraktion III''':<br>Unterschied nicht signifikant |
| $N_2 = 6$  | $T_r = 32$       |                                                                  |
| $T_1 = 15$ | $2\alpha = 0,05$ |                                                                  |

Vergleich von Fraktion II''' mit IV''' :

|            |                  |                                   |
|------------|------------------|-----------------------------------|
| $N_1 = 4$  | $T_1 = 10$       | Fraktion II''' / Fraktion IV''' : |
| $N_2 = 4$  | $T_r = 26$       | Unterschied nicht signifikant     |
| $T_1 = 15$ | $2\alpha = 0,05$ |                                   |

Vergleich von Fraktion III''' mit IV''' :

|            |                  |                                    |
|------------|------------------|------------------------------------|
| $N_1 = 4$  | $T_1 = 12$       | Fraktion III''' / Fraktion IV''' : |
| $N_2 = 6$  | $T_r = 32$       | Unterschied nicht signifikant      |
| $T_1 = 21$ | $2\alpha = 0,05$ |                                    |

Vergleich von Fraktion I'' (10 Werte) mit Gruppe 2

|             |                  |                               |
|-------------|------------------|-------------------------------|
| $N_1 = 10$  | $T_1 = 145$      | Fraktion I'' / Gruppe 2 :     |
| $N_2 = 31$  | $T_r = 275$      | Unterschied nicht signifikant |
| $T_1 = 228$ | $2\alpha = 0,05$ |                               |

Vergleich der zusammengefaßten Fraktionen I''' - IV''' (Stichprobe 1, 20 Werte) mit den Aktivitäten nach zusätzlicher Drehung des Stapes (Stichprobe 2, 10 Werte)

|             |                  |                               |
|-------------|------------------|-------------------------------|
| $N_1 = 10$  | $T_1 = 110$      | Stichprobe 1/Stichprobe 2 :   |
| $N_2 = 20$  | $T_r = 200$      | Unterschied nicht signifikant |
| $T_1 = 135$ | $2\alpha = 0,05$ |                               |

Vergleich von Fraktion I'' mit den zusammengefaßten Fraktionen nach Stapesluxation und Drehung (30 Werte)

|            |                  |                                    |
|------------|------------------|------------------------------------|
| $N_1 = 10$ | $T_1 = 142$      | Fraktion I'' /zusammengef. Frakt.: |
| $N_2 = 30$ | $T_r = 268$      | Fraktion I'' signifikant niedriger |
| $T_1 = 57$ | $2\alpha = 0,05$ |                                    |

(6300) Berechnung der Kinetik-Typen

1.) Befund

Wie SÜDHOF und WÖTZEL in Klin. Wschr. 38 (1960), Seite 1165 zeigen (43), nimmt die Aktivität der MDH in Serumproben beim Aufbewahren in folgender Weise ab:

Tabelle 20: Abfall der Enzymaktivität im Serum nach SÜDHOF und WÖTZEL

| t  | $A' = \frac{A_t}{A_3}$ |
|----|------------------------|
| 0  | -                      |
| 3  | 1                      |
| 6  | 0,9872                 |
| 12 | 0,8950                 |
| 24 | 0,8300                 |
| 48 | 0,7865                 |

Anmerkung:  $A_t$  : mittlere MDH-Aktivität zum Zeitpunkt t,  $A_3$  : Aktivität 3 Stunden nach Entnahme, t : Zeit in Stunden

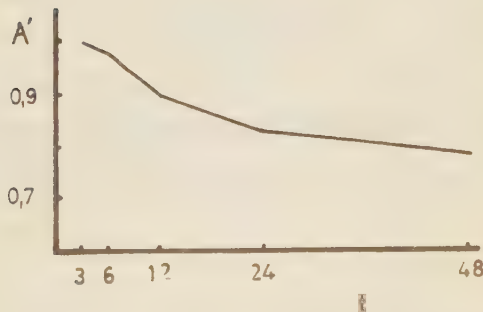


Abbildung 7: Graphische Darstellung zu Tabelle 20

## 2.) Problem

- a) Sehr häufig können die Enzymaktivitäten nicht unmittelbar nach Gewinnung der Proben gemessen werden. So muß, um vergleichbare Werte zu erhalten, die MDH-Aktivität auf die Zeit 0 extrapoliert werden. Man setzt voraus, daß dieser Abfall die einzige Störung bei der Bestimmung ist,

Frage 1 : Wie groß ist die Nullaktivität?

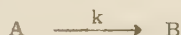
- b) Interessant im Sinne des Stoffwechsels wäre festzustellen, ob die Inaktivierung unbedingt oder bedingt irreversibel sein kann.

Frage 2 : Ergeben sich Anzeichen für das Vorhandensein eines Enzyminhibitors?

## 3.) Lösung

Einen klärenden Beitrag zu diesem Problem vermögen kinetische Methoden erbringen. Anhand von verschiedenen Modellrechnungen wird überprüft, inwieweit der experimentell von SÜDHOF und WÖTZEL gefundene Enzymabfall erklärt werden kann.

### 3a) Kinetik-Typ 1:



(Erklärung: A: Enzymkonzentration zur Zeit t, B: inaktives Zerfallsprodukt, k: Zerfallskonstante)

Prüfung auf Reaktionstyp  $A \longrightarrow B$ :

$\log \frac{A_t}{A_3}$  gegen t aufgetragen muß eine Gerade ergeben, deren Steigung die Maßzahl für k ist. Die Werte, so dargestellt, ergeben:

Tabelle 21: Abfall der Enzymaktivität im Serum nach SÜDHOF und WÖTZEL

| t  | $\log \frac{A_t}{A_3}$ |
|----|------------------------|
| 3  | 0                      |
| 6  | -0,00568               |
| 12 | -0,04915               |
| 24 | -0,08145               |
| 48 | -0,10458               |

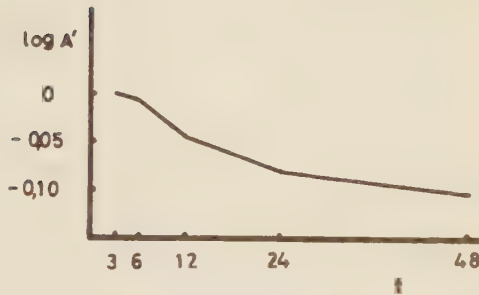
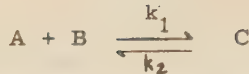


Abbildung 8: Graphische Darstellung zu Tabelle 21.  $A' = \frac{A_t}{A_3}$ .

Befund: Die Meßergebnisse von Tabelle 21 weichen erheblich von einer Geraden ab, so daß hiernach ein natürlicher Zerfall auszuschließen ist.

3b) Kinetik-Typ 2:



(Erklärung: A: Enzymkonzentration, B: Inhibitorkonzentration, C: Konzentration des Enzym-Inhibitor-Komplexes,  $k_1$ : Bildungskonstante von C,  $k_2$ : Zerfallskonstante von C;  $A_o$ ,  $B_o$ : Enzym- bzw. Inhibitorkonzentration zum Entnahmezeitpunkt).

Eine einfache Prüfung auf diesen Reaktionstyp bei angenommener großer Verdünnung des Enzyms ergibt sich durch unmittelbare Auswertung des Differentialansatzes

$$\frac{d\left(\frac{A_t}{A_3}\right)}{dt} = -A_3 k_1 \left(\frac{A_t}{A_3}\right)^2 + (k_1 (A_o - B_o) - k_2) \left(\frac{A_t}{A_3}\right) + k_2 \left(\frac{A_o}{A_3}\right) \text{ oder einfach}$$

$$y = a_1 \cdot x^2 + a_2 \cdot x + a_3,$$

wobei anstelle  $\frac{dx}{dt}$  der obere bzw. untere Differenzenquotient

$$\frac{\Delta \frac{A_t}{A_3}}{\Delta t} = y \text{ eingesetzt wird. Bei Anwendung von 4 bzw. 3 Punkten}$$

aus Tabelle 20 mit den oberen 4 bzw. unteren 4 Differenzenquotienten ergeben sich die Werte:

Tabelle 22: Werte für  $a_1$ ,  $a_2$  und  $a_3$

| Nr. | N | $a_1$  | $a_2$  | $a_3$  |
|-----|---|--------|--------|--------|
| 1   | 4 | 0,428  | -0,835 | 0,403  |
| 2   | 4 | 1,049  | -1,886 | 0,833  |
| 3   | 3 | -0,336 | 0,517  | -0,204 |
| 4   | 3 | -0,645 | 0,964  | -0,359 |

Die Konstanten schwanken nicht statistisch um einen festen Betrag, sondern zeigen systematische Abweichungen (siehe Abbildung 9), so daß

zwischen zwei Wertepaaren jeweils eine lineare Beziehung existiert.  
Das widerspricht dem Reaktionstyp  $A + B \rightleftharpoons C$ .

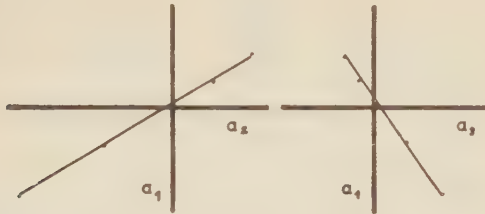


Abbildung 9: Zusammenhang zwischen  $a_1$ ,  $a_2$  und  $a_3$ .

### 3c) Kinetik-Typ 3:

Der Reaktionstyp



Erklärung: A: Konzentration des Enzyms, B: Konzentration eines inaktiven rückbildungsfähigen Isomeren, C: Konzentration eines inaktiven nicht rückbildungsfähigen Isomeren,  $k_1$ : Bildungskonstante von B,  $k_2$ : Rückbildungskonstante von B,  $k_3$ : Bildungskonstante von C

führt zu einem Differentialansatz, dessen Lösung für  $\frac{A_t}{A_3}$  folgende formale Form annimmt:  $\frac{A_t}{A_3} = u_1 v_1^t + u_2 v_2^t$ . Unter der Bedingung, daß  $t_{n+1} = 2 t_n$  ist, können für  $v_1^t$  iterativ bei vorgegebenem  $v_2^t$  im Bereich von  $v_2^t \geq 0,001$  folgende Werte ermittelt werden:

Tabelle 23: Errechnete Werte für  $v_1^t$  bei vorgegebenem  $v_2^t$ ,  
 $A_{t1}$ ,  $A_{t2}$ ,  $A_{t3}$

|          |        |        |        |
|----------|--------|--------|--------|
| $A_{t1}$ | 1,000  | 0,9872 | 0,8950 |
| $A_{t2}$ | 0,9872 | 0,8950 | 0,8300 |
| $A_{t3}$ | 0,8950 | 0,8300 | 0,7865 |
| $v_2^t$  |        |        |        |
| 0,001    | 0,952  | 0,981  | 0,993  |
| 0,01     | 0,952  | 0,981  | 0,993  |
| 0,1      | 0,950  | 0,982  | 0,993  |
| 0,3      | 0,943  | 0,983  | 0,993  |
| 0,6      | 0,918  | 0,992  | 0,994  |
| 0,9      | 0,688  | 1,241  | 1,010  |

Es ist ersichtlich, daß  $v_1^t$  nur in den Spalten 2 und 3 die Bedingung erfüllen kann.

In zweiter Näherung erhält man

$$v_2^{t1} = 0,635 \quad \text{und} \quad v_1^{t1} = 0,99463.$$

Mit Verwendung dieser Werte werden über eine Regressionsgerade erster Art die optimal angepaßten Größen

$$u_1 = 0,231 \quad \text{und} \quad u_2 = 0,858$$

bestimmt. Danach wäre der Enzymabfall in den ersten 3 Stunden etwa 10 %. Wie genau diese Hypothese die experimentell gefundenen Werte zu befriedigen vermag, zeigt die untenstehende Tabelle.

Tabelle 24: Gefundene und berechnete Werte für  $\frac{A_t}{A_3}$ .

| t  | $\frac{A_t}{A_3}$ |           |
|----|-------------------|-----------|
|    | gefunden          | berechnet |
| 0  | -                 | 1,088     |
| 3  | 1,0000            | 1,000     |
| 6  | 0,9872            | 0,941     |
| 12 | 0,8950            | 0,877     |
| 24 | 0,8300            | 0,828     |
| 48 | 0,7865            | 0,787     |

Man darf daraus schließen, daß die Inaktivierung der MDH nach dem letztgenannten Typ verlaufen kann.

+) (Anmerkung: u und v sind konstante Größen und Funktion der Geschwindigkeitskonstanten).

## (7000) DISKUSSION

=====

Da neben den Absolutwerten unser Interesse besonders dem Enzymaktivitätsvergleich gilt, ist es wichtig, daß in allen Untersuchungen die relativen Verhältnisse erhalten bleiben. Aus diesem Grund wurde methodisch bei allen Bestimmungen in gleicher Weise verfahren. Das Fassungsvermögen der Mikroküvette betrug immer 30  $\mu$ l, die Volumina von vier der fünf Pipetten für die Reagenzien des Testansatzes, darunter auch der Probenpipette, lagen zwischen 0,5 und 1  $\mu$ l. Da die Handhabung geringster Probemengen naturgemäß erhebliche experimentelle Schwierigkeiten und damit Fehlermöglichkeiten mit sich bringt, sind die Abweichungen bei sämtlichen Messungen in gleicher Größen-

ordnung. Die Fehlermöglichkeiten wurden unter 2200 ausführlich diskutiert.

Nach Berücksichtigung der verschiedenen Fehlerquellen fand sich beim Menschen eine mittlere MDH-Aktivität in 50 Perilymph von  $95,6 \pm 29,9$  int.m.E., bei 60 Kapillarseren  $63,5 \pm 27,9$  int.m.E., bei 50 venösen Seren  $43,5 \pm 15,4$  int.m.E. und bei 50 Lumballiquores  $18,3 \pm 6,3$  int.m.E. Bei Überprüfung mit dem WILCOXON-Test waren diese vier Mittelwerte alle signifikant voneinander verschieden.

Besondere Bedeutung hat der Vergleich der Enzymaktivitäten in der Perilymphe mit denen in Liquor und Serum. Wie bereits erwähnt, müßte die Perilymphe, sofern sie sich aus Liquor bildet, ähnliche Aktivitäten wie dieser aufweisen. Denkbar wäre noch ein geringer positiver Aktivitätsgradient zwischen Liquor, Scala tympani und Scala vestibuli, der durch einen Eindickungsvorgang verursacht sein könnte. Tatsächlich zeigt sich aber zwischen Perilymphe und Liquor des Menschen der größte Unterschied. Beim Meerschweinchen konnte außerdem gezeigt werden, daß sich die Werte aus Scala vestibuli der Basalwindung von denjenigen aus der Scala tympani nicht unterscheiden. SILVERSTEIN (38) fand bei der Katze in Scala vestibuli und Scala tympani ähnliche Aktivitäten für LDH, MDH, Gesamtprotein und Glukose, im Liquor jedoch war die Konzentration deutlich niedriger. Diese Befunde stützen die Hypothese der Perilymphbildung aus dem Serum.

Schon ähnlicher sind die mittleren Aktivitäten von venösem Serum und Perilymphe des Menschen, wobei letztere jedoch immer noch mehr als doppelt so hoch ist. Nimmt man eine ungehinderte Passage der MDH aus dem Serum durch die Wände der Kapillaren der perilymphatischen Räume an, so wären etwa die gleichen Aktivitäten wie im Serum zu erwarten. Die höheren Perilymphwerte lassen folgende Erklärungsmöglichkeiten zu:

- a) es kann sich einmal um eine durch das Operationstrauma bedingte Erhöhung der MDH-Aktivität handeln, worauf anschließend noch eingegangen wird, oder

b) die höheren Werte sind durch endocochleare Prozesse bedingt. Hier könnte zum Beispiel unter anderem an den Eindickungsvorgang einer aus Liquor entstandenen Perilymphe gedacht werden. Es besteht jedoch keine Notwendigkeit, diese Vorstellung als zwingend anzusehen, nachdem insbesondere Anreicherungen um den Faktor 4 nur in stark fluktuierenden Systemen gefunden werden. Solche Hypothesen experimentell zu bestätigen oder zu verneinen, stößt heute und wohl auch noch für einige Zeit auf erhebliche Schwierigkeiten.

Bezüglich der Maschengröße der endocochlearen Kapillarwände dürfen die Ergebnisse von Tierversuchen nicht auf den Menschen übertragen werden, da man bereits innerhalb verschiedener Tierspezies unterschiedliche Befunde erhält. Trotzdem sollen sie hier eingeflochten werden. So fanden OTTAVIANI et al. (27) in der Taubenperilymphe vorwiegend niedermolekulare Proteine. Nach Adrenalin- oder Histamingaben konnten sie ein deutliches Ansteigen auch der höhermolekularen Proteine beobachten. Beim Meerschweinchen konnte RADEMACHER (30) einen Filterprozeß nicht nachweisen, da er in der Perilymphe  $\gamma$ -Globuline und höchstmolekulare Lipoproteide fand.

Was die MDH betrifft, darf man annehmen, daß sie als relativ kleines Molekül das Maschenwerk der Kapillarwände in der menschlichen Schnecke fast ungehindert passieren kann und deshalb in Serum und Perilymphe ähnliche Konzentrationen zu erwarten sind. Es muß jedoch betont werden, daß in einer Stichprobe von 16 Fällen sich trotz Ähnlichkeit hinsichtlich Mittelwert und Streuung keine Korrelation (Korrelationskoeffizient  $r = 0,07$ ) der MDH-Aktivität zwischen Serum und Perilymphe ergab.

Im Gegensatz zur MDH ist der Gesamtproteingehalt in der Perilymphe wesentlich niedriger als im Serum (RAUCH, 31, SCHINDLER, SCHNIEDER und WULLSTEIN, 33, SILVERSTEIN, 38, RADEMACHER, 30). In letzterem befinden sich Proteine mit höchstem Molekulargewicht.

Bezogen auf die meisten untersuchten Substanzen, zeigt die Perilymphe weitaus mehr Ähnlichkeit mit Serum als mit Liquor. Dies trifft für die eigenen Untersuchungen an der MDH-Aktivität ebenfalls zu.

Zwei Humanperilymphe aus nicht-otosklerotischen Ohren lagen mit einem Mittelwert von 58, 1 int. m. E. deutlich unter dem Mittelwert aller 50 Perilymphe von 95, 6 int. m. E. Wenn auch auf Grund von nur zwei Werten keine statistischen Aussagen möglich sind, so ist es doch denkbar, daß diese niedrigen MDH-Aktivitäten dadurch zustandekommen, daß das Material relativ vorsichtig durch das Ringband entnommen werden konnte, so daß nur ein geringes Operationstrauma auftrat oder daß durch Zerstörung eines tympanosklerotischen Ringbandes weniger MDH befreit wird. Die übrigen 48 Perilymphe wurden von vier verschiedenen Operateuren während Stapedolysen gewonnen, welche für das Innenohr doch ein erhebliches Trauma darstellen. Da es schwer zu erklären ist, daß die Aktivitäten in der Perilymphe wesentlich über diejenigen im venösen Serum liegen sollen und zudem sich fand, daß zwischen der Aktivität beider Stichproben keine Korrelation besteht, liegt die Vermutung nahe, daß die wahre Enzymaktivität in der Perilymphe durch das Operationstrauma verfälscht, und zwar erhöht wird. Hierfür sprechen auch die differierenden Mittelwerte der MDH-Aktivität bei den nach den Operateuren geordneten Stichproben, die wahrscheinlich durch einen etwas verschiedenen Operationsstil bedingt sind.

Um den Einfluß äußerer Einwirkungen im Bereich des ovalen Fensters auf die MDH-Aktivität der Perilymphe genauer zu studieren, wurden die Tierversuche durchgeführt.

Zunächst wurde durch ein Bohrloch in der Scala vestibuli der basalen Schneckenwindung die Perilymphe in 4 aufeinanderfolgenden Fraktionen abgenommen. Dabei war die Fraktion I (= Gruppe 1) mit einem Mittelwert von  $110,7 \pm 59,4$  int. m. E. gegenüber den zusammengefaßten Fraktionen II bis IV (= Gruppe 2) mit dem Mittelwert von  $73,9 \pm 43,2$  int. m. E. signifikant erhöht. Die Ursache dürfte aus dem Bohrloch ausgeschwemmte

Knochen-MDH sein. Der Mittelwert der Fraktionen II bis IV entsprach den Werten, die bei vorsichtiger Perilymphentnahme durch das Ringband erhalten wurden (Mittelwert  $67,1 \pm 20,9$  int. m. E.). Da bei dieser Methode das Operationstrauma an der Entnahmestelle nur gering war, dürften die gefundenen MDH-Aktivitäten den wahren Perilymphwerten recht nahe kommen.

In 20 Fällen von Stapesluxation in das Vestibulum und Perilymphentnahme aus dem ovalen Fenster fand sich eine mittlere Enzymaktivität von  $338,2 \pm 164,0$  int. m. E. Sie liegt damit etwa fünf mal höher als bei den vorsichtig entnommenen Perilymph. Ob der Stapes nur in das Vestibulum luxiert oder anschließend noch etwas um seine Längsachse gedreht wurde, machte sich statistisch nicht bemerkbar.

Damit besteht zwischen der Stärke des Operationstraumas und der MDH-Aktivität in der Perilymphe ein direkter Zusammenhang. Deshalb kann mit gewissem Vorbehalt durch Tierversuche die Vermutung bestätigt werden, daß der Mittelwert von  $95,6$  int. m. E. für Humanperilymphe zu hoch liegt. Eine weitere Bestätigung dieser Vermutung könnte nur eine Serie extrem ringbandschonender Entnahmen erbringen.

Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse muß es deshalb noch offenbleiben, wie weit sich der Korrelationskoeffizient zwischen Perilymphe und venösem Serum zu ändern vermag, offen bleiben muß weiterhin, ob bei Kenntnis der wahren MDH-Aktivität in der Perilymphe der signifikante Unterschied gegenüber dem venösen Serum weiterhin bestehen bleibt. Möglicherweise ist mit einer Reduktion der Enzymaktivität zu rechnen, etwa so wie sich bei der Meerschweinchenperilymphe die Gruppen 1 und 2 unterscheiden.

Die orientierenden Versuche mit der Ultrazentrifuge haben gezeigt, daß bereits die MDH-Isozyme von  $1 \mu$ l Perilymphe aufgetrennt werden können. Welchem Isozym die größere Sedimentationskonstante zu-

kommt, können nur weitere verfeinerte Messungen ergeben. Es ist denkbar, daß mit dieser Methode in Zukunft Aussagen über Herkunft und Menge der bei einem Trauma im Bereich des ovalen Fensters vermehrt gefundenen MDH-Aktivität gemacht werden können. Hierzu ist es notwendig, speziell das Verhalten der Knochen- und Ringband-MDH bei der Ultrazentrifugation zu untersuchen.

Die parallel laufende Auftrennung der Meerschweinchenperilymphe mit Hilfe der Mikroelektrophorese und anschließende Anfärbung durch Tetrazoliumsalze ergab nur eine sicher nachweisbare Fraktion. Das Verfahren erlaubt für Mengen von 1 - 2  $\mu$ l noch keine genauere Differenzierung der MDH-Isozyme.

Allenfalls sind Aufschlüsse über die Isozym-Zusammensetzung durch die Immunelektrophorese zu erwarten.

## (8000) ZUSAMMENFASSUNG

Der Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Bestimmung der MDH-Aktivität in der Perilymphe. Ihre Kenntnis erlaubt Aussagen über die Entstehung der Perilymphe, sowie über den Grad des mechanischen Traumas bei einer Operation im Bereich des ovalen Fensters.

Die zur Verfügung stehenden geringen Perilymphmengen erforderten die Ausarbeitung spezieller mikroanalytischer Methoden. Die hiermit verbundenen experimentellen Schwierigkeiten zwangen zu einer ausführlichen Betrachtung der vielfachen Verfälschungsmöglichkeiten der Enzymaktivitäten durch methodische Fehler, Aufbewahrungs- und Entnahmefehler, sowie durch pathologische Zustände im Organismus.

Für die untersuchten Stichproben ergaben sich folgende mittleren MDH-Aktivitäten:

|               |                            |
|---------------|----------------------------|
| Perilymphe    | $95,6 \pm 29,9$ int. m. E. |
| Kapillarserum | $63,5 \pm 27,9$ int. m. E. |
| venöses Serum | $43,5 \pm 15,7$ int. m. E. |
| Liquor        | $18,3 \pm 6,3$ int. m. E.  |

Die größte Verschiedenheit fand sich zwischen Perilymphe und Liquor. Damit dürfte der Ursprung der Perilymphe schwerlich im Liquor zu suchen sein. Es ist vielmehr anzunehmen, daß sie aus den perilymphatischen Wänden nachströmt, deren Wände Maschengrößen besitzen, die das relativ kleine MDH-Molekül passieren lassen.

Nachdem sich jedoch zeigte, daß die MDH-Aktivität größer als im venösen Serum, ja noch größer als im Kapillarserum ist, mußte nach einem weiteren Faktor gesucht werden, der diese Erhöhung verursachen kann. Ein Hinweis war die Tatsache, daß bei Zuordnung der MDH-Aktivität in der Perilymphe zu den jeweiligen Operateuren sich gewisse Beziehungen herausbildeten. Es fanden sich nämlich deutliche Unterschiede der mittleren Enzymaktivitäten. Da die MDH in Bindegewebe

und Knochen vorkommt, wurde gefolgert, daß die mechanischen Traumen bei der Operation die MDH-Aktivität der Perilymphe beeinflussen können. Die zur Abklärung unternommenen Meerschweinchenversuche bestätigen dies. Demgemäß spiegeln die hierbei gefundenen Werte nur die unter Operationsbedingungen gewonnene MDH-Aktivität wieder. Die wahre Aktivität liegt wahrscheinlich tiefer. Möglicherweise verhält sich die wahre Aktivität  $A_w$  zur effektiv gemessenen ( $A_{eff}$ )  $A_w : A_{eff} \approx A_{SV} : A_{SK} \approx A_{Gruppe\ 2} : A_{Gruppe\ 1} \approx 0,67\ %$ .

Beim Meerschweinchen fanden sich die niedrigsten MDH-Werte, wenn die Perilymphe vorsichtig durch das Ringband entnommen wurde. Bei Entnahme durch ein Bohrloch in der Scala vestibuli der basalen Schneckenwindung war die MDH-Aktivität der Fraktion I den zusammengefaßten nachfolgenden Fraktionen gegenüber statistisch signifikant erhöht. Die Fraktionen II, III und IV entsprachen den Werten bei vorsichtiger Entnahme durch das Ringband.

Bei reiner Luxation des Stapes in das Vestibulum sowie bei nachfolgender Drehung um seine Längsachse wurden 4 - 5 mal höhere Werte als bei der vorsichtigen Entnahme gefunden. Bezüglich der MDH-Aktivität bestand kein Unterschied zwischen Scala vestibuli und Scala tympani.

Bei Versuchen mit der Ultrazentrifuge deuteten sich in der Meerschweinchenperilymphe 2 Typen von MDH-Isozymen an, von denen derjenige mit der niedrigeren Sedimentationskonstante in geringer, der andere mit der größeren Sedimentationskonstante in höherer Konzentration vorlag.

Beim Versuch einer elektrophoretischen Auftrennung der MDH ebenfalls von Meerschweinchenperilymphe wurde unter den gegebenen Pufferbedingungen nur eine kathodisch wandernde deutliche Fraktion gefunden. Daraus wird gefolgert, daß bei der Stapelsuxation vorwiegend cytoplasmatische MDH entsteht.

(9000) LITERATURVERZEICHNIS

- 1) BARNETT, H.:                   Zuschrift in: The Lancet 28 (1962),  
Seite 199
- 2) Fa. BECKMAN :                Eine Einführung in die Dichtegradienten-Zentrifugation  
Beckman Instruments G.m.b.H., München, Februar 1962, Seite 19
- 3) BERGMAYER, H.-U.:        Methoden der enzymatischen Analyse  
Verlag Chemie G.m.b.H., Weinheim/Bergstr., 1962, Seiten 8, 32
- 4) Fa. BOEHRINGER:        MDH-Test, Bestimmung der Aktivität der Malat-Dehydrogenase im Serum, Betriebsanleitung, 4. Auflage, Mannheim, Januar 1963
- 5) BRUNS, F.H. et al.:       Studien über die Ursachen des Enzymverlustes der geschädigten Zelle  
Klin. Wschr. 39 (1961), Seite 342
- 6) DAVIES, D. und            zitiert in KUN, VOLFIN  
E. KUN:
- 7) DELBRÜCK, A.:            Untersuchungen über Enzyme des Energie-Stoffwechsels im Bindegewebe  
Klin. Wschr. 40 (1962), Seite 677
- 8) DELBRÜCK, A.:            Enzymverteilungsmuster gefäßloser Gewebe  
Klin. Wschr. 41 (1963), Seite 488
- 9) DELBRÜCK, A.,            Über Verteilungsmuster von Enzymen des Energie liefernden Stoffwechsels im Flugmuskel, Sprungmuskel und Fettkörper von Locusta migratoria und ihre cytologische Zuordnung  
E. ZEBE und  
TH. BÜCHER:                Biochem. Zeitschr. 331 (1959), Seite 273
- 10) DELBRÜCK, A.,           Enzym-Verteilungsmuster in einigen Organen und in experimentellen Tumoren der Ratte und der Maus  
H. SCHIMASSEK,  
K. BARTSCH und  
TH. BÜCHER:                Biochem. Zeitschr. 331 (1959), S. 297

- 11) DIXON, M. und E. C. WEBB: Enzymes, second edition Longmans, Green and Co. Ltd., London, 1964, Seiten 268, 453
- 12) Documenta GEIGY: Wissenschaftliche Tabellen, 6. Auflage, 1960
- 13) ENGELHARDT-GÖLKEL, A., R. LÖBEL, W. SEITZ und I. WOLLER: Über das Verhalten und die Herkunft glykolytischer Serumenzyme beim Menschen und ihre diagnostische Bedeutung Klin. Wschr. 36 (1958), Seite 462
- 14) FOSSA, T.: La malatodeidrogenasi, l'ossalacetato-decarbossilasi, l'uridindifosfogluco-pirofosforilasi e l'uridindifosglucosoglicogeno glucosiltransferasi nel globulo rosso Bull. della Soc. Ital. di Biol. Sperim. Vol. XLI, Fasc. 15, 1965, Seite 821
- 15) GERLACH, U.: Enzymaktivität des Serums im akuten Syndrom Med. Welt 16 (1961), 880
- 16) HAUG, H. und A. G. GATHOF: Über die Altersabhängigkeit der Enzymaktivitäten der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase, Lactatdehydrogenase und Malatdehydrogenase im menschlichen Erythrozyten und im Plasma Blut, Band XIII (1966), Seite 366
- 17) HESS, B.: Über Fermente der Glykolyse und des Citronensäurecyclus im menschlichen Serum insbesondere bei Erkrankungen der Leber Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 63 (Kongreß 1957), Seite 541
- 18) HEYCK, H. und G. LAUDAHN: Fermentaktivitätsbestimmungen in der gesunden menschlichen Muskulatur und bei Myopathien Klin. Wschr. 41 (1963), Seite 905
- 19) HOGEBOM, G. H.: in: Methods in Enzymology: Fractionation of Cell Components of Animal Tissues New York, Academic Press, 1955, Vol. 1, Seite 17

- 20) JENSEN, K.A. und T. LAURSEN: Persönliche Mitteilung.  
Anschrift der Verfasser: Rigshospitalet, Kopenhagen, Dänemark
  
- 21) KUN, E. und P. VOLFIN: Tissue specificity of malate dehydrogenase isozymes. Kinetic discrimination by oxaloacetate and its mono and difluoro analogues  
Biochem. and Biophys. Res. Communications, Vol. 22, No. 2, 1966, Seite 187
  
- 22) LAUDAHN, G.: Tierexperimentelle und biochemische Untersuchungen zur Ursache der gesteigerten Fermentaktivität im Blut bei Leberkrankheiten  
Zeitschr. exp. Med. 132 (1959), S. 346
  
- 23) MARGHESCU, S.: Über mitochondriale und cytoplasmatische Isozyme der Malatdehydrogenase in der psoriatischen Hornschicht  
Archiv für klin. und experimentelle Dermatologie 226 (1966), Seite 92
  
- 24) MEHROTRA, K.N., K. NATH und K. L. SHUKLA: Properties of human serum malate dehydrogenase  
Indian J. Exp. Biol., Vol. 3, April 1965, Seite 142
  
- 25) MERTEN, R. und H. -G. SOLBACH: Enzymverteilungsmuster des glykolytischen Systems und Citronensäurecyclus im Plasma Krebskranker  
Klin. Wschr. 39 (1961), Seite 222
  
- 26) MOUHGRABI, A.: Trennung der Aminosäuren der Perilymphe durch Ionenaustauscher-Dünnschicht-Chromatographie mit Gradientenelution  
Dissertation, Düsseldorf, 1966
  
- 27) OTTAVIANI, A. et al.: Immuno-electrophoretic study of the perilymph  
Acta oto-laryng. (Stockholm) 56 (1963), Seite 715
  
- 28) PEDERSEN, K.O.: in: SVEDBERG, T., PEDERSEN, K.O.: The ultracentrifuge  
Oxford, 1940

- 29) PFLEIDERER, G. und E. HOHNHOLZ: Zum Wirkungsmechanismus von Dehydrogenasen  
Biochem. Zeitschr. 331 (1959), S. 245
- 30) RADEMACHER, A.: Vergleichende elektrophoretische Untersuchungen des Serums und der Perilymphe des Meerschweinchens  
Dissertation, Düsseldorf, 1966
- 31) RAUCH, S.: Biochemie des Hörorgans  
Thieme-Verlag, Stuttgart, 1964
- 32) Report of the Commission on Enzymes of the International Union of Biochemistry (IUB) 1961, Symposium Series Vol. 20, Pergamon Press, London, 1961
- 33) SCHINDLER, K., E. A. SCHNIEDER und H. L. WULLSTEIN: Vergleichende Bestimmung einiger Elektrolyte und organischer Substanzen in der Perilymphe otosklerosekranker Patienten  
Acta oto-laryng. 59 (1965), S. 309
- 34) SCHMIDT, E. und F. W. SCHMIDT: Über Änderungen der Substrataffinität von Malat-Dehydrogenasen im Serum  
Klin. Wschr. 38 (1960), 810
- 35) SCHMIDT, E. und F. W. SCHMIDT: Untersuchungen über optimale Reaktionsbedingungen für Enzym-Aktivitätsbestimmungen in Leberextrakten, in Extrakten anderer Organe und im Serum  
Enzymol. biol. clin. 2 (1962/63), S. 201
- 36) SCHMIDT, E., F. W. SCHMIDT und CH. HERFARTH: Isoenzyme in der menschlichen Leber und ihre intracelluläre Lokalisation  
Klin. Wschr. 40 (1962), Seite 1133
- 37) SCHMIDT, E., F. W. SCHMIDT und E. WILDHIRT: Aktivitäts-Bestimmungen von Enzymen des energieliefernden Stoffwechsels im menschlichen Serum und in Leberpunkta-ten bei Lebererkrankungen  
Klin. Wschr. 36 (1958), Seite 280
- 38) SILVERSTEIN, H.: Biochemical studies of the inner ear fluids in the cat  
Annals of Otology, Rhinology and Laryngology, Vol. 75, No. 1, 1966, S. 48

- 39) SITZMANN, F.C.: Die klinische Bedeutung der Äpfelsäuredehydrogenase  
Med. Klinik 49 (1964), Seite 1929
- 40) STARK, G. und K. IWANOV: Das Verhalten der Transaminasen (GOT, GPT) und Dehydrogenasen (LDH, MDH) im Serum nach Cytostaticabehandlung bei Carcinompatientinnen  
Klin. Wschr. 42 (1964), Seite 375
- 41) Statistisches Bundesamt, Wiesbaden Bevölkerung und Kultur, Reihe 2: Natürliche Bevölkerungsbewegung  
Kohlhammer-Verlag, Stuttgart und Mainz, 1965
- 42) STRAUB, B.F.: Äpfelsäuredehydrogenase  
In: HOPPE SEYLER/ THIERFELDER: Handbuch physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse. 10. Auflage, Sechster Band/Teil A, Seite 367  
Springer-Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg, New York, 1964
- 43) SÜDHOF, H. und E. WÖTZEL: Über die Haltbarkeit von zur Enzymaktivitätsbestimmung vorgesehener Serumproben  
Klin. Wschr. 38 (1960), Seite 1165
- 44) THORNE, C., L. GROSSMAN und N. KAPLAN: Starch-gel electrophoresis of malate dehydrogenase  
Biochim. Biophys. Acta 73 (1963), Seite 193
- 45) WICHMANN, D.: Der methodische Meßfehler bei einigen Serum-Enzym-Testen (SGOT, SGPT, a PHOS, s PHOS, LDH, MDH, ALD)  
Klin. Wschr. 43 (1965), Seite 467



Herrn Professor Dr. Wullstein gebührt mein besonderer Dank für die freundliche Überlassung des Themas sowie die großzügigen Arbeitsbedingungen, die er mir in seiner Klinik gewährte.

Herrn Dr. K. Schindler danke ich vielmals für die Anleitung und Beaufsichtigung meiner Arbeiten, Herrn Dr. E. A. Schnieder für die Einführung in die Operationstechnik bei den Tierversuchen.



Auszüge aus den Kapiteln 2 und 3 wurden mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg in Arch.  
Otolaryng., Vol. 84, Oct. 1966, S. 386 veröffentlicht.



## LEBENS LAUF

=====

Am 23. Januar 1939 wurde ich, Christian v. Deuster, als Sohn des Forst- und Landwirts Karl v. Deuster und seiner Ehefrau Gertrud, geborene v. Köckritz, in Bamberg geboren.

Von 1945 bis 1951 besuchte ich die Volksschule in Ditterswind, Kreis Hofheim/Unterfranken, danach das Realgymnasium mit Oberrealschule im Abbau in Bad Kissingen, wo ich im Juli 1959 das Abitur ablegte.

Nach zwei Semestern Rechtswissenschaft an der Universität Würzburg begann ich ebenfalls in Würzburg mein Medizinstudium. Im Oktober 1961 bestand ich das Vorphysikum und im Oktober 1963 das Physikum. Nach den ersten zwei klinischen Semestern an der Universität München wechselte ich an die Universität Würzburg zurück, wo ich nach dem Sommersemester 1966 die ärztliche Prüfung ablegte.

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und außer der angegebenen Literatur keine weiteren Hilfsquellen benutzt habe.

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich bisher von keiner anderen Seite ein Dissertationsthema zur endgültigen Bearbeitung erhalten habe.

*Christian Deuster*





OFFSETDRUCK GUGEL

Würzburg, Burkarderstr. 9